

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DE ENZIMAS EXÓGENAS EM REGIMES
ALIMENTARES À BASE DE MILHO E TRIGO NOS ÍNDICES ZOOTÉCNICOS DE
FRANGOS DE CARNE

LÍGIA DE FÁTIMA PINHÃO TEIXEIRA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor João Pedro Bengala Freire

Doutor Carlos Mendes Godinho de
Andrade Fontes

Doutora Madalena dos Santos Lordelo
Redford

ORIENTADOR

**DOUTORA MARIA MADALENA DOS
SANTOS LORDELO REDFORD**

CO-ORIENTADOR

**DOUTORA TERESA PAULA COSTA
RIBEIRO**

2013

LISBOA

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Madalena Lordelo Redford, pela oportunidade que me concedeu, pelos conhecimentos transmitidos e principalmente por todo o apoio e disponibilidade prestadas. O meu muito obrigada!

À Doutora Teresa Ribeiro, por ter aceite ser minha co-orientadora, por todos os conhecimentos, ajuda e conselhos dados, pela amizade e bons momentos. Muito obrigada!

Ao Engenheiro Bruno Correia, por me ter acompanhado e ajudado ao longo de todo o trabalho experimental. Obrigada!

Às minhas colegas e amigas Vânia Cardoso, Elisabete Fernandes e Raquel Lourinhã, pela ajuda que me deram ao longo de todo o trabalho prático, pela companhia e bons momentos passados, tornando todo este longo percurso muito mais fácil de ser feito. Obrigada principalmente pela amizade que acabou por nos unir!

Ao meu grande amigo Pedro Oliveira, por se ter sujeitado a tarefas que nunca antes tinha realizado, em nome da nossa grande amizade. Um valente obrigada!

Ao Ricardo Almeida, pela companhia e apoio psicológico prestados durante todo o trabalho experimental e pelos seus excelentes serviços de tradutor. Mas principalmente, pela paciência que teve comigo ao longo destes cinco anos de percurso académico, por todo o carinho, amor e amizade. O meu sincero obrigada!

Aos meus pais, por todo o apoio e esforço que fizeram para eu chegar até aqui. Sem eles não teria sido possível. O meu muito muito obrigada! Um especial agradecimento à minha mãe pela ajuda que me deu todos os fins-de-semana, durante a realização do ensaio experimental, nunca me deixando ir sozinha alimentar os comilões.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito de diferentes suplementações enzimáticas em regimes alimentares à base de milho e trigo, em frangos de carne, no período dos 0 aos 35 dias de idade. O alimento fornecido foi suplementado com diferentes níveis e tipo de mistura enzimática: 0 % (CN); 0,005 % da mistura comercial XG (XG) ou 0,025 % da mistura comercial XAP (XAP). A mistura comercial XAP continha xilanase, protease e amilase e a mistura XG continha xilanase e glucanase. O PV dos animais sujeitos ao tratamento XAP foi superior aos 7 e 21 dias de idade, após o qual não se encontraram diferenças entre tratamentos até ao final do ensaio. Aos 19 dias de idade, a viscosidade do conteúdo digestivo do íleo dos animais sujeitos ao tratamento XAP foi inferior à dos animais alimentados com CN, não diferindo de XG. A atividade xilanásica foi influenciada pelo tratamento XAP apenas no jejuno. Conclui-se que uma suplementação enzimática com os níveis considerados de protease, amilase e xilanase tal como de glucanase e xilanase não conduziu a diferenças entre tratamentos para os diferentes parâmetros produtivos, às 5 semanas de idade, apesar da vantagem inicial verificada para o tratamento XAP.

Palavras-Chave: Frangos de carne, milho, enzimas exógenas, protease, amilase, glucanase, xilanase.

Abstract

The present trial was conducted with the aim of determining the effect of different types of enzyme supplementation on corn and wheat based diets for broilers, between 0 and 35 days of age. The feed was supplemented with different levels and types of enzyme mixture: 0% (CN); 0.005% of the commercial mixture XG (XG) or 0.025% of the commercial mixture XAP (XAP), consisting in 3 treatments, each one with 8 repetitions. The commercial mixture XAP contained xylanase, amylase and protease and the XG mixture contained xylanase and glucanase. The animals submitted to the XAP treatment showed a superior live weight between the day 7 and 21. Afterwards no differences between treatments were found until the end of the trial. On day 19, the viscosity of ileum's digestive content in birds consuming diets supplemented with XAP was lower than CN and not different from XG. Xylanase activity was affected by the treatment XAP only on the jejunum. In conclusion, enzyme supplementation with the considered levels of xylanase, amylase and protease, as well as glucanase and xylanase did not lead to differences in broilers' performance, among treatments at 5 weeks of age.

Key-words: broilers, corn, exogenous enzymes, protease, amylase, glucanase, xylanase.

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice.....	v
Lista de Figuras	vii
Lista de Quadros	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Capítulo I - Introdução	1
Capítulo II – Revisão Bibliográfica	2
1. Evolução da Nutrição e Produção Avícola.....	2
2. Frangos de carne	6
Constituição do sistema digestivo.....	6
Desenvolvimento do sistema digestivo do frango	9
3. Alimentação	11
Polissacáridos não amiláceos.....	12
4. Enzimas	16
Definição.....	16
Uso de enzimas	17
Enzimas exógenas em avicultura	18
5. Estado de arte.....	20
6. Objetivos	21
Capítulo III – Materiais e Métodos.....	22
1. Preparação dos Regimes Alimentares	22
2. Tratamentos	24
3. Animais e Instalações	25
4. Análises Laboratoriais	27
Ensaio enzimático.....	27
Atividade enzimática dos conteúdos digestivos e do alimento	28
Viscosidade dos conteúdos digestivos.....	29
5. Análise Estatística	29
Capítulo IV – Resultados	30
1. Performances Zootécnicas.....	30
1.1. Peso Vivo	30
1.2. Alimento Ingerido	31
1.3. Índice de Conversão	32

2. Viscosidade dos conteúdos digestivos	34
3. Dimensões dos órgãos do tubo digestivo	35
4. Atividade enzimática das misturas comerciais de enzimas.....	37
5. Avaliação da atividade enzimática dos conteúdos digestivos e dos regimes alimentares	38
Capítulo V – Discussão.....	41
Conclusão.....	47
Referências Bibliográficas	48

Lista de Figuras

Figura 1 - Representação do sistema digestivo do frango.....	9
Figura 2 - Estrutura molecular da celulose.	13
Figura 3 - Estrutura molecular do β -glucano.	14
Figura 4 - Estrutura molecular do arabinoxilano.	15
Figura 5 - Distribuição dos tratamentos CN, XAP e XG pelos parques.....	25
Figura 6 - Curva padrão utilizada para estimar a quantidade de glucose libertada devido à ação enzimática, através do valor de absorvância lido.	28
Figura 7 - Atividade enzimática basal do alimento correspondente aos três tratamentos: CN, XAP e XG.....	38
Figura 8 - Exemplo da técnica utilizada para avaliar a atividade xilanásica dos conteúdos digestivos de dois animais do tratamento CN, de dois animais do tratamento XAP e de outros dois do tratamento XG	39
Figura 9 - Exemplo da técnica utilizada para avaliar a atividade glucanásica dos conteúdos digestivos de dois animais do tratamento CN, de dois animais do tratamento XAP e de outros dois do tratamento XG	40

Lista de Quadros

Quadro 1 - Composição química do milho e do trigo, expressa em % MS. (Adaptado de Mateos et al, 2010).	12
Quadro 2 - Tipo e nível de polissacáridos não amiláceos nos grãos do milho, trigo e cevada, em % MS (Adaptado de Choct, 1997).	16
Quadro 3 - Composição centesimal e nutricional do alimento concentrado-base de iniciação (0 - 18 dias).....	22
Quadro 4 - Composição centesimal e nutricional do alimento concentrado-base de crescimento (19 - 35 dias).....	23
Quadro 5 - Resultados da análise à composição química do alimento concentrado base de iniciação e de crescimento.	24
Quadro 6 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no peso vivo de frangos de carne (g).....	30
Quadro 7 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no peso vivo de frangos de carne (g), durante o período de iniciação (0 - 19 dias) e de crescimento (19 - 34 dias).....	31
Quadro 8 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na quantidade de alimento ingerido (g/ave).	32
Quadro 9 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na quantidade de alimento ingerido (g/ave), durante o período de iniciação (0 - 19 dias) e de crescimento (19 - 34 dias).....	32
Quadro 10 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no índice de conversão dos animais.	33
Quadro 11 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no índice de conversão dos animais, durante o período de iniciação (0 - 19 dias) e de crescimento (19 - 34 dias).....	34
Quadro 12 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na viscosidade dos conteúdos digestivos (em cpo) aos 19 dias de idade (fim do período de iniciação).	34
Quadro 13 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na viscosidade do conteúdo digestivo (em cpo) aos 35 dias de idade (fim do período de crescimento).	35
Quadro 14 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no peso relativo dos órgãos do tubo digestivo (g/kg PV).....	36
Quadro 15 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na dimensão relativa dos órgãos do tubo digestivo (cm/kg PV).	36
Quadro 16 - Atividade enzimática (U/g enzima) verificada em amostras das duas misturas enzimáticas comerciais utilizadas (XAP e XG) perante diferentes substratos.	37
Quadro 17 - Avaliação da atividade xilanásica no alimento e nas amostras dos conteúdos digestivos ¹	39
Quadro 18 - Avaliação da atividade glucanásica no alimento e nas amostras dos conteúdos digestivos ¹	40

Lista de Abreviaturas

CN - Controlo Negativo

EE - Extracto Étereo

EMA - Energia metabolizável aparente

EMV - Energia metabolizável verdadeira

FB - Fibra Bruta

FEDNA - Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal

GM - Ganho Médio

IC - Índice de Conversão

ISA - Instituto Superior de Agronomia

NRC - National Research Council

PB - Proteína Bruta

PV - Peso Vivo

PNA - Polissacáridos não amiláceos

UE - União Europeia

XAP - Tratamento contendo suplementação de xilanase, amilase e protease

XG - Tratamento contendo suplementação de xilanase e glucanase.

Capítulo I - Introdução

Atualmente, a carne de frango é uma das carnes mais consumidas no mundo inteiro devido às suas características nutricionais e ao seu baixo preço. O fato de ser uma carne branca com reduzido teor em gordura torna-a uma das primeiras escolhas dos consumidores, que cada vez mais se preocupam com a saúde. Os avanços verificados no domínio da genética, nutrição, sanidade e manejo têm permitido um aumento da produção de carne de frango, de forma mais rápida e eficiente, possibilitando a sua colocação no mercado a preços muito competitivos.

A alimentação das aves baseia-se na utilização de cereais. Na grande parte dos países ocidentais, o milho é preferencialmente utilizado na constituição dos alimentos compostos para aves, principalmente porque é uma fonte rica em amido que, regra geral, é facilmente utilizável pelo seu simples tubo digestivo. Contudo, hoje em dia, assiste-se a uma competição entre alimentação humana, produção de biocombustíveis e alimentação animal, pelas mesmas matérias-primas, o que provoca um aumento nos seus preços de venda. Como a alimentação ocupa um peso considerável nos custos totais da produção animal tem sido necessário encontrar estratégias para que esta continue viável. Nos últimos anos, a utilização de diversas enzimas exógenas tem sido recorrente para aumentar o valor nutritivo de matérias-primas alternativas ao milho, como o trigo, a cevada e o centeio.

As dietas à base de milho continuam a ser as mais eficientes para as aves, devido à sua alta digestibilidade e valor energético. No entanto, a possibilidade de aumentar o valor nutritivo do milho através da suplementação destas dietas com uma enzima ou com uma mistura de enzimas que possua um espectro de atividade alargado, continua a existir. A adição de enzimas a dietas à base de milho não é muito frequente mas tem vindo a ser questionada, pois poderá permitir um incremento do valor energético destas dietas. Como consequência do aumento do preço da energia na alimentação animal nos últimos anos, esta hipótese tem sido colocada pois poderá permitir uma redução dos custos de produção, principalmente nos países ocidentais que utilizam o milho em abundância. Considera-se assim que a adição de preparações adequadas de enzimas possa ainda aumentar o valor nutricional das dietas à base de milho. No entanto, atualmente existem poucos estudos que avaliem esta hipótese.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito da incorporação de dois complexos multienzimáticos, um com atividade de xilanase, amilase e protease e outro com atividade de glucanase e xilanase, numa dieta à base de milho, nos índices produtivos de frangos de carne.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

1. Evolução da Nutrição e Produção Avícola.

A nutrição é uma ciência relativamente recente que data de meados do século XX e que assenta em várias disciplinas de base, tais como a bioquímica e fisiologia.

O seu aparecimento permitiu a introdução e a compreensão de conceitos como a composição nutricional dos alimentos e as necessidades alimentares e nutricionais dos animais. No caso da avicultura, é em 1942 que surgem as primeiras definições de necessidades nutricionais das aves e, em 1944, são publicadas as primeiras tabelas de requisitos nutricionais avícolas do National Research Council (NRC) (Larbier et al., 1991).

Dentro do contexto científico, pelo facto da galinha ser um animal pequeno e de crescimento rápido, é frequentemente alvo de investigação, o que tem permitido que grandes progressos tenham vindo a ser conseguidos no domínio da nutrição avícola (Mountney, 1988). Segundo Larbier et al. (1991), em avicultura é mais evidente a relação íntima entre o desenvolvimento da nutrição, genética e sanidade porque uma nutrição eficiente permite reduzir o risco de patologias relacionadas com carências e, ao nível da genética, possibilita que os genótipos exteriorizem melhor o seu potencial para a produção, favorecendo o melhoramento por seleção. Como resultado destes avanços científicos e tecnológicos, os sistemas de produção foram-se alterando, passando progressivamente de simples sistemas tradicionais para sistemas altamente intensivos.

Até aos anos 50, os animais eram criados em número reduzido, maioritariamente ao ar livre, sendo alimentados pelo criador com restolho de uma agricultura de subsistência, ingerindo também vegetais e invertebrados disponíveis na natureza (Englert, 1982).

Segundo Larbier et al. (1991), a maioria das descobertas científicas, sobre as quais assenta a nutrição avícola, teve origem nos Estados Unidos da América e no Canadá. Entre elas, lista o aparecimento da noção de vitaminas em 1909, para definir fatores alimentares secundários. Hoje em dia, sabe-se que todas as vitaminas desempenham um papel específico no organismo e que as suas ações estão interligadas com as de outros nutrientes. No entanto, a descoberta da vitamina D3, em 1932, foi particularmente importante pois viria a permitir, mais tarde, a produção de aves na total ausência de raios solares. A introdução de vitamina D3 sintética nas

rações foi um dos fatores responsáveis pela produção de aves à escala industrial, ou seja, em grande número e em total confinamento, sem problemas de raquitismo (Englert, 1982).

A produção intensiva de aves bem como as primeiras unidades de fabrico de alimentos para animais surgiram por volta de 1950. O sucesso da produção intensiva de aves deveu-se também à inclusão de coccidiostáticos no alimento (Larbier et al., 1991). Segundo Ribeiro et al. (2000), a coccidiose é uma das principais doenças avícolas, causada por protozoários que infectam o intestino das aves, com consequente redução da utilização dos nutrientes e diminuição do crescimento. É em 1947 que surgem os primeiros coccidiostáticos eficazes (Larbier et al., 1991), com a utilização de sulfonamidas. A partir de 1971, passou a utilizar-se maioritariamente a monensina como agente coccidiostático (Ribeiro et al., 2000). Mais tarde, em 1980 é identificado um novo grupo, os inóforos poliéteres, no qual se inclui a monensina, entre outros e, cuja utilização na União Europeia (UE) tem aumentado desde a proibição dos antibióticos promotores de crescimento (Guardabassi, 2008). Segundo o Regulamento n.º 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho, desde 2000 que existem no mercado vacinas contra a coccidiose para frangos de engorda, das quais apenas uma é autorizada na UE embora outras duas estejam disponíveis num determinado número de países. Estudos recentes (Abbas et al., 2011) mostraram que o ácido acético tem um poder anticoccidial contra *Eimeria tenella*, podendo ser uma potencial alternativa aos agentes coccidiostáticos.

Atualmente, nos países mais desenvolvidos, predomina um sistema de produção intensivo, que se caracteriza pela sua alta produtividade e eficiência, conseguida, em grande parte, devido a uma alimentação nutricionalmente equilibrada. A alimentação é o fator de produção mais relevante pois representa 65 a 85 % dos custos totais, dependendo dos ingredientes incorporados e dos seus preços de mercado (Mountney, 1988; Ravindran, 2012). É, por isso, muito importante conseguir uma formulação correta que satisfaça as exigências nutricionais dos animais, ao menor custo. Esta necessidade surge com a intensificação da produção, tendo os primeiros calculadores analógicos, utilizados na formulação de alimentos com vista à sua otimização, aparecido em 1955 (Larbier et al., 1991).

Segundo Baptista (1984), a formulação das dietas para aves era função de um determinado nível energético porque a quantidade de alimento ingerida por estes animais era inversamente proporcional à concentração energética do alimento, o que condicionava os teores dos restantes nutrientes necessários. Desta forma, tornou-se

indispensável conhecer corretamente o valor energético dos ingredientes e da dieta a formular.

Ao longo do tempo, vários estudos foram realizados no sentido de encontrar um método preciso, rápido e simples para determinar a energia dos alimentos disponível para as aves. Por exemplo, em 1946, Fraps introduziu um sistema de energia produtiva que consistia numa análise técnica da carcaça de frangos em crescimento para medir a retenção energética, após o fornecimento de um único alimento (Baptista, 1984; Hill et al., 1958). Mais tarde, Hill et al. (1958) constatou que a energia metabolizável era a melhor forma de medir a energia dos alimentos que é efetivamente utilizada pelas aves, em comparação com a energia produtiva uma vez que esta apresentava valores muito variáveis para um único alimento devido às diferenças individuais dos animais. Porém, como o método da energia metabolizável não tinha em conta as perdas de energia fecal metabólica nem de energia urinária endógena, media apenas a energia metabolizável aparente (EMA) (Baptista, 1984). Assim, Sibbald (1976) propôs o sistema de energia metabolizável verdadeira (EMV) que implicava sujeitar os animais a um jejum de 24 horas antes e depois da ingestão forçada de alimento. Este estudo permitiu avaliar isoladamente as perdas metabólicas, consideradas constantes e independentes do alimento fornecido, para poder subtraí-las às perdas totais, mostrando que os valores de EMA eram inferiores e apresentavam maior variabilidade. Segundo o NRC (1994), também o sistema de EMV foi alvo de críticas pois estudos posteriores mostraram que as perdas metabólicas variavam de acordo com a quantidade e tipo de alimento ingerido. Há que referir ainda que autores como Hill e Anderson consideraram necessário corrigir o balanço de azoto em ambos os sistemas pois a sua retenção ou oxidação, por parte do animal, altera o valor energético das excreções e, conseqüentemente, da EMA ou EMV. No entanto, outros como Sibbald et al. (1963) consideravam tratar-se de uma fração insignificante não necessitando de ser contabilizada (NRC, 1994).

Também a conceção de necessidades das aves em proteína tem vindo a sofrer alterações ao longo do tempo. Hoje sabe-se que as exigências em aminoácidos essenciais é determinante para a produção enquanto antigamente se considerava apenas o teor de proteína bruta (PB). Adicionalmente, as proporções relativas entre aminoácidos essenciais têm que ser tidas em conta e expressas em termos da sua digestibilidade (Barbosa et al., 2002).

A suplementação de aminoácidos sintéticos é hoje largamente utilizada para facilitar os ajustes nas fórmulas de ração (Scheuermann et al., 1995), tendo a primeira forma sintética de metionina começado a ser comercializada em 1945 e a da lisina em 1958 (Larbier et al., 1991). Esta consciência permitiu não só uma melhor satisfação

das necessidades nutricionais como uma diminuição na quantidade de azoto excretado para o meio ambiente.

Ultimamente, o maior foco de pesquisa na área da nutrição das aves tem sido a identificação das barreiras à digestão e à eficiente utilização dos nutrientes, de forma a que os animais aproveitem melhor os nutrientes presentes nas dietas (Ravindran, 2012). Assim, nos anos 80 a indústria avícola sofreu uma revolução com a introdução de enzimas nos alimentos para os animais. Numa primeira fase, o uso de enzimas responsáveis pela degradação de fibra, tais como xilanases e glucanases, permitiu o combate dos efeitos negativos associados à viscosidade intestinal resultante da incorporação de grandes teores de trigo, cevada e centeio nas dietas das aves. (Choct, 2006).

Uma década mais tarde surgiram as fitases, com o primeiro produto comercial lançado no mercado em 1991. Em certas regiões geográficas, a poluição pela libertação de fósforo, nas produções intensivas de suínos e aves, era tão elevada que existiam penalizações severas às explorações que ultrapassassem os limites. É desta urgência e preocupação pelo impacto ambiental deste tipo de explorações que surgem as fitases (Bedford, 2008). Na matéria vegetal, o fósforo existe sob a forma de fitatos, uma forma biologicamente indisponível para os animais monogástricos que não possuem enzimas endógenas que consigam libertá-lo para ser absorvido. Por isso, o fósforo mineral era adicionado às dietas de forma satisfazer as necessidades dos animais e assim evitar carências. A introdução de fitases na alimentação dos monogástricos permitiu maximizar a utilização do fósforo proveniente dos alimentos vegetais, proporcionando uma diminuição na necessidade de adição do fósforo inorgânico adicionado às dietas e uma redução de 50 % de fósforo excretado para o meio ambiente (Greiner et al., 2010).

A utilização de enzimas tem-se intensificado nestes últimos 30 anos, o que permitiu recorrer a matérias-primas com menor digestibilidade, com benefícios na performance dos animais, devido ao maior aproveitamento dos alimentos pelo animal, e no meio ambiente, devido à redução de resíduos nas excreções. No entanto ainda existem algumas questões quanto ao modo de ação das enzimas exógenas, e assim o estudo do seu real impacto na alimentação animal continua a ser alvo de investigação (Cowieson et al., 2005). Segundo Choct (2006), a indústria tem como objetivo investigar e desenvolver enzimas eficazes que atuem também em grãos pouco viscosos, como é o caso do milho e ainda em ingredientes não cerealíferos, como o bagaço de soja. Mombaerts et al. (2012) refere estudos recentes que mostram os efeitos positivos da adição de xilanases em dietas à base de milho, na flora intestinal de frangos de carne, apesar dos baixos níveis de polissacáridos não amiláceos (PNA)

neste tipo de dieta. Desta forma, para além de atuarem ao nível da redução da viscosidade e da disponibilização de nutrientes, as enzimas passam também a desempenhar um papel prébiotico pois ao serem capazes de produzir oligossacáridos, que servem de substrato para populações específicas de microrganismos, melhoram a saúde intestinal dos frangos (Mombaerts et al., 2012). O benefício destes compostos depende do tipo e da quantidade produzida uma vez que diferentes enzimas geram diferentes oligossacáridos. Muitas espécies benéficas de bactérias são capazes de utilizar estes produtos, libertando ácidos gordos voláteis que são uma fonte de energia para o animal e ainda uma forma de controlo de microrganismos patogénicos (Bedford, 2008).

2. Frangos de carne

Constituição do sistema digestivo

A digestão diz respeito ao conjunto de processos físicos e químicos que ocorrem ao longo do tubo digestivo durante a passagem do alimento. Desta forma, as ligações complexas dos nutrientes são quebradas, dando origem a componentes químicos mais simples que podem ser absorvidos pela parede intestinal, passando para o sangue para serem utilizados no metabolismo das células do organismo (Bell et al., 1990).

As aves são portadoras de um sistema digestivo monogástrico relativamente simples e curto. Ao contrário do que ocorre nos ruminantes, o tempo de retenção do conteúdo digestivo é baixo e a microflora existente bastante escassa, levando a que haja pouco tempo de ação para que os microrganismos presentes na flora intestinal possam intervir de forma significativa na digestão. Assim, os processos digestivos das aves dependem maioritariamente das suas secreções enzimáticas (Mountney, 1988).

Os órgãos constituintes do aparelho digestivo da ave incluem o bico, a cavidade bucal, glândulas salivares, língua, faringe, esófago, papo, proventrículo, moela, intestino delgado e grosso, cecos e cloaca. Consideram-se órgãos anexos ao tubo digestivo o pâncreas, fígado e vesícula biliar.

Uma das particularidades das aves é não possuírem lábios nem dentes, apresentando no seu lugar um bico córneo que lhes permite apreender o alimento e parti-lo em dimensões mais pequenas, se necessário, de forma a que possa ser deglutido (Appleby et al., 1992; Mountney, 1988).

A ausência do palato mole e da epiglote faz com que a boca e a faringe formem uma cavidade única, motivo pelo qual a água ingerida por estes animais ocorre de forma passiva, graças à orientação e movimentação da cabeça (Larbier et al., 1991).

As glândulas salivares presentes na cavidade bucal são numerosas e dispersas, sendo responsáveis pela produção do chamado suco salivar, cuja principal função é a lubrificação do bolo alimentar. É rico em bicarbonato de sódio, o que lhe confere um pH na ordem dos 7 a 7,5, e em α -amilase, iniciando-se logo a digestão do amido na cavidade bucal que continua no papo e moela, embora em pequena escala pois há pouco tempo para a atuação enzimática (Leeson et al., 2001; Larbier et al., 1991).

A língua é pontiaguda e fortemente queratinizada com a superfície traseira rugosa, para forçar o alimento humedecido a descer pelo esófago, até atingir o papo (Bell et al., 1990; Appleby et al., 1992).

O papo é uma dilatação do esófago que armazena temporariamente o alimento, onde este é amolecido devido à presença de saliva e água ingerida. O tempo de permanência do bolo alimentar no interior do papo depende da sua capacidade volumosa, da dimensão das partículas do alimento, do grau de humedecimento do mesmo e do nível de alimento na moela (Larbier et al., 1991). Por este motivo, considera-se que o papo funciona como regulador do trânsito digestivo, principalmente no caso de animais sujeitos a uma alimentação racionada, distribuída por refeições ao longo do dia (Mountney, 1988). No papo verifica-se já uma descida do pH para 4,5 e alguma digestão do amido por parte da α -amilase presente na saliva, se o tempo de permanência do alimento for suficiente (Leeson et al., 2001).

Saído do papo, o quimo chega a uma pequena cavidade oval, alojada no final esófago, denominada por proventrículo ou estômago verdadeiro. Este é revestido por um fino epitélio glandular que segrega uma proenzima proteolítica, o pepsinogénio, e ácido clorídrico. O ácido clorídrico é responsável por alterar o pH do meio para cerca de 2,5, iniciando a quebra dos tegumentos duros das sementes. O pepsinogénio é o precursor da pepsina que é uma enzima que atua na digestão da proteína, quebrando-a em polipéptidos. Contudo, pouca ou nenhuma digestão acontece no proventrículo devido à sua reduzida dimensão que faz com que o quimo passe rapidamente para o compartimento seguinte (Larbier et al., 1991).

A moela, por sua vez, é conhecida por estômago muscular, encontrando-se entre o proventrículo e o duodeno. Possui poderosos músculos, capazes de exercer uma grande força, que através de contrações e expansões transformam qualquer partícula do alimento numa pasta semi-líquida, pronta a entrar no intestino (Bell et al., 1990; Englert, 1982). Segundo Bell e al. (1990), apesar de não existir qualquer

secreção enzimática nesta zona, continua a verificar-se um ambiente ácido, ocorrendo alguma digestão do alimento devido às enzimas libertadas no proventrículo.

Imediatamente abaixo da moela, começa o intestino delgado que se prolonga até à inserção dos cecos, onde tem início o intestino grosso.

A parte inicial do intestino delgado consiste no duodeno que apresenta a forma de uma alça, no meio da qual se encontra o pâncreas (Englert, 1982). Terminada a alça duodenal, segue-se o jejuno e, finalmente o íleo. A separação entre o jejuno e o íleo é marcada pelo divertículo de Meckel, uma pequena saliência localizada na parte exterior do intestino delgado.

As principais secreções enzimáticas são lançadas ao nível do duodeno enquanto que a absorção dos nutrientes se dá no jejuno (Leeson et al., 2001).

O pâncreas segrega o suco pancreático constituído por amilases, lipases e precursores de proteases, nomeadamente da tripsina, que atuam ao nível do intestino delgado, e ainda iões bicarbonato. Estes iões vão promover a subida de pH para a ordem dos 6 a 6,8 no interior do intestino delgado, de modo a tornar possível a atuação das enzimas (Leeson et al., 2001).

O fígado é o responsável pela produção da bÍlis cujo local de ação é também o intestino delgado. Trata-se de um suco ácido sem capacidade enzimática que tem como principal função emulsionar as gorduras para que estas se tornem solúveis, facilitando o processo de digestão. A bÍlis entra na parte final do duodeno, através de dutos biliares, podendo vir diretamente do fígado, através do duto esquerdo, ou da vesícula biliar, que consiste num pequeno reservatório de bÍlis existente no duto biliar direito (Bell et al., 1990).

A hidrólise mais significativa dos hidratos de carbono ocorre no intestino delgado, principalmente graças à α -amilase do suco pancreático, libertado no duodeno. Durante esse processo, as ligações glucosídicas α -1,4 são quebradas, originando produtos como a glucose, maltose e outros oligossacáridos uma vez que as ligações α -1,6 se mantêm intactas. Conjuntamente, a parede do intestino delgado produz suco intestinal que contém α -glucosidases capazes de hidrolisar as ligações α -1,6, quebrando a maltose e outros oligossacáridos em glucose que é rapidamente absorvida pelas paredes do intestino (Leeson, 2001). Também apresenta na sua constituição peptidases para a hidrólise de péptidos em aminoácidos, não existindo uma área especializada para atuação da flora microbiana na digestão do alimento.

A absorção de nutrientes dá-se principalmente no jejuno, através das vilosidades presentes nas suas paredes, entrando diretamente na corrente sanguínea (Leeson et al., 2001; Mountney, 1988). Por sua vez, na última secção do intestino delgado, o íleo, verifica-se ainda produção de enzimas (Bell et al., 1990).

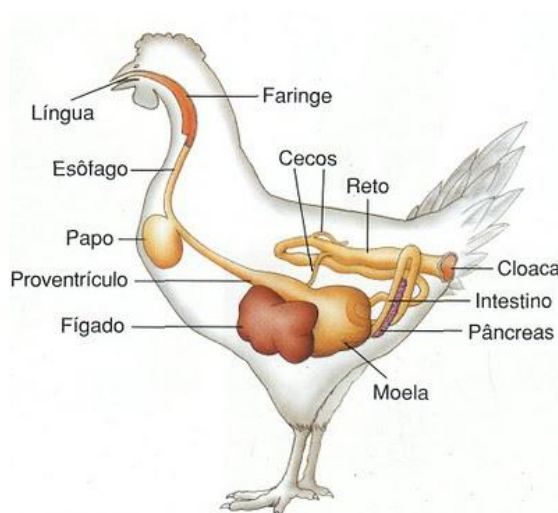
Os cecos são duas bolsas sem saída localizadas na inserção do intestino delgado com o intestino grosso. A exata função dos cecos é desconhecida mas parece não ter um papel importante na digestão. Pensa-se que ao longo da evolução destes animais, os cecos teriam sido capazes de digerir fibra através de uma ação microbiana (Appleby et al., 1992). Leeson et al. (2001) sugerem a existência de fermentações microbianas nos cecos e alguns estudos (Fontes et al., 2004; Ponte et al., 2008) têm ainda detetado a ocorrência de atividade enzimática nos seus conteúdos.

O intestino grosso, frequentemente chamado de reto, é muito curto e estende-se até à cloaca. Aqui ocorre uma reabsorção de água, importante para a manutenção do balanço de água na ave.

A cloaca é a porção final do tubo digestivo, tratando-se de um canal excretor comum a três sistemas: o digestivo, urinário e reprodutor (Larbier et al., 1991).

Na figura 1 encontra-se o esquema do sistema digestivo do frango.

Figura 1 - Representação do sistema digestivo do frango
(trangenicosintocaveis.blogspot.pt/2010/03/sistema-digestivo-das-aves.html).



Desenvolvimento do sistema digestivo do frango

Existem vários estudos focados no desenvolvimento do tubo digestivo do pinto, no sentido de determinar quais os fatores limitantes ao crescimento inicial desta ave jovem. Muitos destes estudos centram-se no crescimento do intestino delgado e aumento da função da sua mucosa (Noy et al., 1997, Uni et al., 1998, Noy et al., 2001) e outros no incremento da secreção e atividade enzimática (Noy et al., 1997, Sklan et al., 2000).

O desenvolvimento do tubo digestivo do frango é muito precoce uma vez que o intestino do embrião começa a formar-se a partir do segundo dia de incubação. Imediatamente após a eclosão, o tubo digestivo do pinto chega a representar cerca de um quarto do seu peso vivo, embora esta proporção diminua rapidamente ao longo do seu crescimento até representar apenas 5 % às 8 semanas de idade (Larbier et al., 1991).

Segundo Noy et al. (1997), nos dias que seguem a eclosão, o peso do proventrículo, moela e intestino delgado, em relação ao peso vivo do animal, aumenta muito mais rapidamente do que no caso de outros órgãos e tecidos. Depois deste crescimento rápido inicial, os seus tamanhos relativos acabam por diminuir lentamente com a idade. Segundo Uni et al. (1998), o desenvolvimento do intestino delgado é rápido, a partir do dia 2 de idade, após eclosão, embora a taxas de desenvolvimento diferentes para cada uma das secções do intestino. No que toca à mucosa intestinal, o maior aumento das vilosidades das paredes do duodeno ocorre por volta dos 4 dias de idade enquanto, no jejuno e íleo, este aumento dá-se aos 10 dias de idade, verificando-se depois uma redução das suas taxas de crescimento. No caso do duodeno, o aumento do volume das suas vilosidades ainda se prolonga de forma menos significativa até aos 10 dias de idade e, no caso do jejuno e íleo, até aos 14 dias de idade (Noy et al., 1997, Uni et al., 1998). No final, o volume das vilosidades do jejuno é superior, seguido do duodeno e do íleo (Uni et al., 1998).

A secreção enzimática do tubo digestivo do frango é anterior à eclosão pois estudos verificaram a presença de amilase e tripsina ao dia 18 de incubação. Também a existência da lipase foi já detetada em período de incubação (Noy et al., 1997).

No dia 19 de incubação, o saco vitelino é incorporado na cavidade abdominal do embrião, representando cerca de 20 % do peso vivo do pinto à eclosão (Uni et al., 1998, Noy et al., 2001). Este é constituído maioritariamente por lípidos e proteína, sendo o responsável pelo fornecimento de energia para a manutenção do pinto, nos momentos após a eclosão, e ainda para o crescimento do intestino (Noy et al., 1999, Noy et al., 2001). Por essa razão, a atividade enzimática da lipase no intestino é requerida, mesmo antes da ingestão de alimento, para a hidrólise dos triglicéridos presentes no conteúdo do saco vitelino e, por isso, a gordura é mais facilmente absorvida do que a glucose ou a proteína nos primeiros dias de vida. Contudo, essa capacidade acaba por diminuir lentamente com a idade. Como no período logo após a eclosão, o organismo do frango transfere a sua dependência do saco vitelino para passar a utilizar o alimento exógeno (Sklan et al., 2000), a atividade enzimática no intestino delgado começa a sofrer alterações para se adaptar ao novo substrato presente (Noy et al., 1997). Assim, Noy et al. (1999) verificou um aumento da

absorção da glucose de 52 % para 90 %, e da metionina de 53 % para 80 %, do primeiro para os 4 dias de idade.

A concentração de amilase, tripsina e lipases no pâncreas e a sua secreção para o duodeno aumenta após a eclosão, apesar da taxa de aumento ser diferente para cada enzima (Noy et al., 1997). Segundo Sklan et al. (2000), a secreção de suco pancreático para o duodeno aumenta significativamente com a idade devido não só ao aumento da ingestão de alimento mas também ao crescimento dos órgãos do tubo digestivo. Entre os 4 e os 21 dias de idade, a secreção diária de amilase, em função da cada grama de alimento ingerido, é maior e a de lipase é menor. O pico de secreção de tripsina é verificado aos 4 dias de idade e de amilase aos 7 dias de idade. No caso da lipase, a sua secreção é relativamente constante por grama de alimento ingerido, diminuindo a partir dos 10 dias de idade (Noy et al., 1997).

Tanto a secreção de bÍlis como de suco pancreático é baixa à eclosão e parece não ser suficiente até aos 4 dias de idade, tornando-se finalmente adequada por volta dos 10 dias de idade. Por sua vez, a secreção da bÍlis aumenta ainda até aos 21 dias de idade, momento após o qual começa a diminuir (Noy et al., 1997).

3. Alimentação

Os grãos de cereais são os principais ingredientes das dietas das aves devido às suas propriedades, sendo a mais relevante o seu alto teor energético (Verstegen, 2009). Por outro lado, de uma forma geral, são deficitários em vitaminas e minerais (Mateos et al., 2010).

O milho é o cereal por excelência para a alimentação das aves domésticas, na maior parte dos países ocidentais, uma vez que o seu valor energético é dos mais elevados de entre os cereais (Labier et al., 1991). É igualmente apreciado pela sua alta palatabilidade, pela reduzida variabilidade na sua composição química e baixo teor em fatores antinutritivos.

O seu grão é constituído por 6 % de pericarpo, 11 % de gérmen e 83 % de endosperma que é rico em amido facilmente degradável pelo tubo digestivo da ave (Mateos et al., 2010). Apresenta um teor de gordura relativamente elevado, sendo uma boa fonte de ácido linoleico mas pobre em proteína bruta (PB), cujo teor pode ir dos 8 aos 11 %. Além disso, o perfil de aminoácidos deste cereal é bastante desequilibrado, verificando-se uma deficiência em lisina e triptofano e um excesso de leucina (Bell et al., 1990). Também a sua fração fibrosa é baixa e constituída essencialmente por celulose e pentosanas.

O milho é rico em xantófilas disponíveis e eficazes na coloração da pele dos frangos geneticamente aptos a fixar estes pigmentos (Labier et al., 1991).

Por sua vez, o trigo é também um dos principais cereais utilizados na alimentação avícola mas apenas quando se encontra disponível em quantidade. Por ser muito utilizado na alimentação humana, geralmente o seu preço é elevado (Bell et al., 1990). Uma das desvantagens da utilização do trigo é a alta variabilidade da sua composição química (Mateos et al., 2010).

O valor da sua energia metabolizável, expressa em matéria seca (MS), é próxima da do milho e varia pouco consoante o local ou ano de cultura. As maiores diferenças do valor energético verificam-se no que toca à maturidade da planta, podendo ser atribuídas à má digestibilidade do amido em certos lotes. Uma parte das diferenças pode também dever-se à sua fração fibrosa que, apesar de ser pouco lenhificada, contém entre 4 e 5 % de arabinoxilanos e 0,5 a 1 % de β -glucanos. Estes polissacáridos não amiláceos solúveis não são degradados pelo tubo digestivo da ave e geram uma maior viscosidade dos conteúdos digestivos (Bell et al., 1990; Mateos et al., 2010).

O trigo apresenta uma maior percentagem de proteína relativamente ao milho, embora dependa das variedades de trigo e das condições agronómicas. No entanto, na maioria dos casos, o teor de proteína bruta (PB) situa-se entre 12 e 15 % MS.

No quadro 1 encontram-se os valores médios da composição química do milho e do trigo, expressos em percentagem de matéria seca.

Quadro 1 - Composição química do milho e do trigo, expressa em % MS. (Adaptado de Mateos et al, 2010).

	H	Cinza	PB	EE	FB	NDF	ADF	ADL	Amido	Açúcares	EM _{aves}
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	kcal/kg
Milho	13,8	1,3	7,9	4,3	2,3	8,3	2,9	2,9	61,2	1,8	3325
Trigo	11,3	1,6	11,7	1,8	2,7	11,4	3,6	3,6	58,2	1,7	3119

Polissacáridos não amiláceos

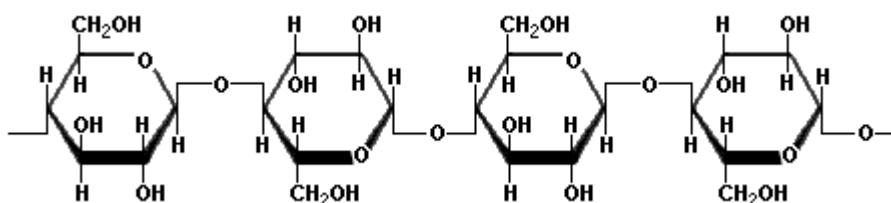
Os hidratos de carbono são polímeros de monossacáridos ligados entre si através de diferentes ligações químicas, podendo ser divididos em hidratos de carbono estruturais e não estruturais.

O aparelho digestivo dos animais monogástricos não consegue digerir os hidratos de carbono estruturais pois não possui enzimas digestivas capazes de quebrar as suas ligações. É o caso dos polissacáridos não amiláceos (PNA) que são uns dos constituintes das paredes das células vegetais e os principais componentes fibrosos dos grãos de cereais, mais especificamente os arabinoxilanos, os β -glucanos e a celulose (Choct, 1997).

Os PNA são classificados essencialmente de acordo com os monossacáridos presentes na sua constituição, posição e configuração (α ou β) das suas ligações glicosídicas. As hexoses como a D-glucose, D-galactose e D-manose bem como as pentoses como a L-arabinose e D-xilose são os monossacáridos que normalmente estão presentes nas paredes das células vegetais dos cereais. A estrutura e constituição dos diferentes PNA condicionam a sua solubilidade em água e são os solúveis que constituem os principais fatores anti-nutritivos dos cereais, para os animais monogástricos.

A celulose é o biopolímero mais abundante da Terra e está presente de 35 a 50 % na célula da planta (Paloheimo et al., 2010). A celulose tem um elevado peso molecular pois é formada por mais de 10.000 unidades de D-glucose ligadas entre si através de ligações β - 1, 4. É insolúvel em água graças à sua estrutura altamente ordenada, constituída por regiões cristalinas e outras amorfas. As regiões cristalinas devem-se ao alinhamento paralelo das microfibrilhas de celulose, ligadas umas às outras por pontes de hidrogénio. Nas regiões amorfas não se verifica o mesmo nível de organização (Choct, 1997; Paloheimo et al., 2010), permitindo uma maior facilidade na quebra destas ligações comparativamente às regiões cristalinas.

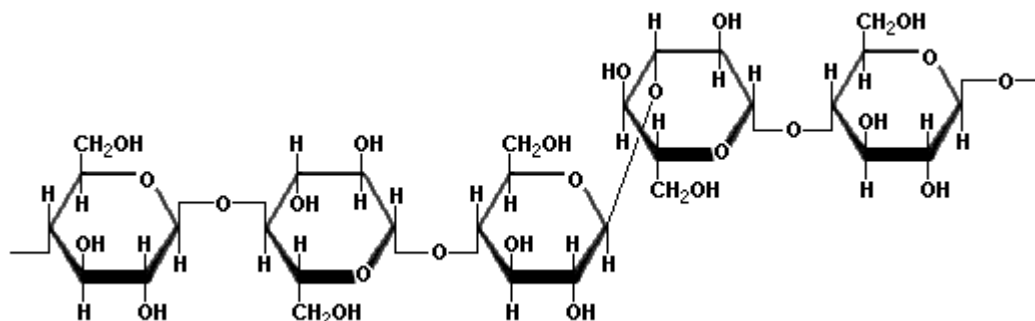
Figura 2 - Estrutura molecular da celulose
(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>).



O β -glucano é encontrado na maioria dos cereais mas é na cevada e na aveia que os seus teores são mais elevados (Marquardt et al., 1996). A sua estrutura é bastante simples: consiste numa cadeia linear de monómeros de glucose, ligados entre si através de ligações β - 1, 3 e β - 1, 4. No caso do trigo, cerca de 70 % das ligações são β - 1, 4 uma vez que a cada duas ligações consecutivas β - 1, 4 segue-se uma ligação β - 1, 3. É a existência de ligações β - 1, 3 que faz com que a estrutura do

β -glucano e da celulose seja diferente e, conseqüentemente, as suas propriedades físicas também. O β -glucano é por isso um polímero solúvel (Choct, 1997).

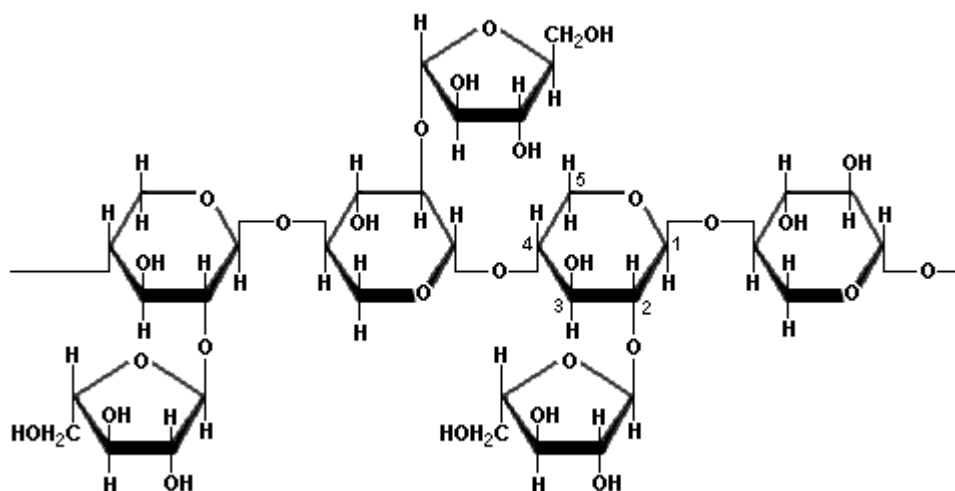
Figura 3 - Estrutura molecular do β -glucano
(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>).



A conformação do arabinoxilano é mais complexa uma vez que se trata de um tipo específico de xilano. O xilano é o maior componente da hemicelulose, sendo o segundo PNA mais abundante na natureza. As suas unidades são xilopiranoses ligadas entre si através de ligações β - 1, 4. O seu grau de polimerização depende do tipo de cereal mas, geralmente, é constituído por cadeias mais curtas que as de celulose. Na maioria dos xilanos, ocorrem grupos substitutos ligados aos monómeros de xilose e, são esses grupos, que determinam a solubilidade, viscosidade e outras propriedades físico-químicas do novo xilano em causa. A extensão e a natureza dos grupos substitutos variam, por exemplo, com a botânica, parte do tecido, idade e época de corte da planta. Normalmente, o xilano presente nas plantas anuais, cereais e pastagens é o arabinoxilano (Paloheimo et al., 2010).

Por ser constituído maioritariamente por duas pentoses, a D-arabinose e a D-xilose, o arabinoxilano é também denominado por pentosana. Em grãos de cereais, o seu peso molecular pode ser bastante elevado (Choct, 1997) e a sua concentração é maior no trigo, centeio e tritcale (Marquardt et al., 1996). A cadeia principal do arabinoxilano apresenta ligações β - 1, 4, de xilose constituindo um esqueleto de xilano, apresentando ramificações de arabinose na posição 3 e, menos frequentemente, na posição 2 (Paloheimo et al., 2010), que constituem as cadeias laterais do xilano. As moléculas de arabinoxilano podem ser insolúveis em água se estabelecerem ligação direta com as paredes celulares. Por outro lado, as que não formam essa ligação, apresentam solubilidade em água, conseguindo absorvê-la em cerca de dez vezes mais que o seu peso e formando soluções altamente viscosas (Choct, 1997).

Figura 4 - Estrutura molecular do arabinoxilano
(<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohidratos2.html>).



Estes dois PNA solúveis, quando presentes em teores elevados nos regimes alimentares, provocam um aumento da viscosidade nos respetivos conteúdos digestivos dos animais. Desta forma, dificultam o movimento dos conteúdos ao longo do tubo digestivo uma vez que abrandam a sua taxa de passagem, o que leva a uma menor ingestão de alimento por parte do animal (Bedford, 2000; Slominski, 2011). Também dificultam a ação das enzimas endógenas na digestão, ao provocarem um efeito de encapsulamento dos nutrientes, o que reduz a sua digestibilidade. Por outro lado, a viscosidade gerada interfere com o transporte dos produtos resultantes da hidrólise através da mucosa intestinal (Slominski, 2011). Como consequência, há um aumento da quantidade de água ingerida, uma diminuição no consumo de alimento e do ganho de peso corporal, com um aumento do índice de conversão alimentar. Há também um aumento do tamanho dos órgãos do tubo digestivo, do número de microrganismos anaeróbicos no intestino grosso e uma maior quantidade de água presente nos conteúdos digestivos e excreções (Marquardt et al., 1996). Todos estes efeitos traduzem-se numa diminuição da performance dos animais e num aumento de ocorrência de camas húmidas, o que normalmente conduz também a problemas patológicos (Bedford, 2008).

No quadro 2 encontra-se a comparação entre os níveis de arabinoxilano, β -glucano e celulose do milho, trigo e cevada.

Quadro 2 - Tipo e nível de polissacáridos não amiláceos nos grãos do milho, trigo e cevada, em % MS (Adaptado de Choct, 1997).

Cereal		Milho	Trigo	Cevada
Arabinosilano	Solúvel	0,1	1,8	0,8
	Insolúvel	5,1	6,3	7,1
B-glucano	Solúvel	-	0,4	3,6
	Insolúvel	-	0,4	0,4
Celulose	Solúvel	-	-	-
	Insolúvel	2,0	0,2	3,9

4. Enzimas

Definição

As enzimas são os catalisadores do mundo vivo, sem os quais a vida tal como a conhecemos não existiria (Scragg, 1988).

A maioria das enzimas são proteínas globulares altamente especializadas, responsáveis pelas reações de catálise nos sistemas biológicos, nos quais assumem um papel central (Nelson et al., 2004). Por possuírem natureza proteica, apresentam um elevado grau de especificidade para o seu substrato, atuando em sequências organizadas de aminoácidos e acelerando todo o processo químico, sem se consumirem (Campos, 1998, Nelson et al., 2004).

Segundo Fersht (1985), existem mais de 1500 enzimas conhecidas, que diferem nos seus arranjos estruturais e no substrato sob o qual atuam.

Cada enzima é um polipéptido com uma sequência única de aminoácidos, embora possa apresentar zonas semelhantes com as de outras enzimas, o que reflete percursos comuns ao longo do processo evolutivo (Cabral et al., 2003). Em condições fisiológicas, a sua cadeia de aminoácidos enrola-se espontaneamente para adquirir uma estrutura tridimensional, o que permite a rotação dos aminoácidos em torno das suas ligações covalentes simples, originando arranjos tridimensionais diferentes. Um arranjo tridimensional energeticamente estável designa-se por conformação, existindo, geralmente, uma única para a qual a enzima mantém a atividade biológica (Cabral et al., 2003). Este enrolamento da molécula é determinante para a formação do centro ativo, que se define como o local específico da enzima onde os seus aminoácidos entram diretamente em contato com o substrato. O centro ativo é formado pelo local

de fixação, onde o substrato se liga à enzima através de ligações fracas, e o centro catalítico, uma pequena região localizada, que é constituída por grupos envolvidos na catálise (Campos, 2008).

Para perceber o modo de ação de uma enzima é preciso conhecer não só a sua estrutura mas também a do complexo formado entre a enzima, substrato, produtos intermediários e finais (Fersht, 1985).

Uso de enzimas

Durante milhares de anos, vários processos produtivos, como o fabrico de pão, queijo, iogurtes e bebidas alcoólicas, envolveram a ação de enzimas embora se desconhecesse a sua existência como tal (Smith, 1996).

Hoje em dia, as enzimas são consideradas produtos da biotecnologia uma vez que podem ser separadas das células vivas que as sintetizam, no seu estado ativo, para posteriormente catalisarem diversos processos bioquímicos (Scragg, 1988). Por serem biodegradáveis e não tóxicas podem ser produzidas em enormes quantidades, a partir de microrganismos. A sua tecnologia envolve ainda a sua extração, purificação e estabilização, de modo a serem utilizadas nas diferentes finalidades de interesse.

As enzimas são cada vez mais empregues ao nível industrial, em setores como o farmacêutico e têxtil, no fabrico de detergentes e, principalmente, na indústria alimentar (Smith, 1996).

Em menor escala mas de uma forma muito importante, as enzimas são também aplicadas no fabrico de alimentos compostos para animais, maioritariamente monogástricos, com o objetivo de minimizar a variabilidade e melhorar o valor nutritivo dos ingredientes incorporados nas rações (Bedford et al., 1998).

A sua introdução na alimentação animal teve início nos anos 80, com o objetivo de suplementar ou compensar a ausência de enzimas endógenas dos organismos. Desde então, possibilita um uso mais económico das matérias-primas ao permitir uma maior eficiência no aproveitamento dos seus nutrientes, com consequente diminuição de desperdícios, o que traz benefícios nos parâmetros produtivos do animal e na redução do impacto ambiental gerado. De uma forma geral, as enzimas são responsáveis pelo aumento da digestibilidade de nutrientes e ainda pela destruição de materiais que possam interferir com a digestão, absorção e utilização dos mesmos. Consoante o tipo de enzima considerado, estas podem aumentar a disponibilidade de fósforo, proteína ou de polissacáridos de reserva da planta, como o amido, que

estejam protegidos das enzimas digestivas através de componentes estruturais das paredes celulares vegetais (MacDonald, 2002).

Enzimas exógenas em avicultura

As aves são as espécies que mais parecem beneficiar do uso de enzimas exógenas, talvez por possuírem um sistema digestivo muito curto que não lhes permite um tempo suficiente de digestão, contrariamente ao que acontece com os suínos (Mavromichalis, 2012). Segundo Bedford et al. (1998), o tempo de passagem do alimento através do tubo digestivo do frango é de apenas 2 a 4 horas, enquanto nos suínos esse tempo pode ir de 12 a 24 horas. Por outro lado, a fase gástrica do frango dura apenas entre 20 a 45 minutos e a do suíno pode durar de 4 a 8 horas. Também a quantidade de humidade presente no intestino delgado dos frangos é menor que nos suínos, o que lhes confere uma viscosidade maior para dietas relativamente semelhantes, fornecidas às duas espécies.

Atualmente, a produção avícola utiliza as enzimas exógenas como componentes fundamentais das suas dietas. As mais utilizadas incluem as celulasas, glucanases, xilanases, amilases, proteases e fitases (Kattak et al., 2006; Slomninski, 2011).

Vários estudos têm demonstrado que as enzimas que hidrolisam os polissacáridos não amiláceos são capazes de aumentar a utilização dos nutrientes pelas aves, uma vez que eliminam o efeito de encapsulamento provocado pelas paredes celulares vegetais e diminuem a viscosidade dos conteúdos digestivos (Slomninski, 2011). Segundo Bedford (2000), a incorporação de glucanases em dietas à base de cevada e a adição de xilanases em dietas à base de trigo ou centeio, melhora a eficácia de utilização de alimento, promove o crescimento dos animais e contribui para um melhor uso de matérias-primas mais baratas. Ao serem adicionadas, estas enzimas provocam a quebra das cadeias dos PNA em polímeros mais simples, diminuindo a sua capacidade de retenção de água e, conseqüentemente, reduzindo a viscosidade dos conteúdos digestivos (Choct, 1997). Assim, há uma maior disponibilidade, digestibilidade e absorção dos nutrientes, o que aumenta o valor da energia metabolizável da dieta. Por outro lado, a ingestão de água diminui enquanto o consumo de alimento aumenta, tal como o ganho de peso corporal, para um índice de conversão alimentar inferior. O rendimento em carcaça também melhora pois o tubo digestivo não aumenta tanto de tamanho, em resposta a um regime alimentar menos rico em fibra (Kattak et al., 2006).

Segundo Bedford et al. (1998), a adição de amilases e proteases exógenas nas dietas têm revelado ser benéfica tanto para aves como suínos. A amilase contribui para a digestão do amido em animais muito jovens (Kattak et al., 2006). Por sua vez, as proteases aumentam a digestibilidade da proteína (Kattak et al., 2006), melhorando a utilização do azoto pelo animal. Isto possibilita a diminuição do teor de proteína incorporada na alimentação e ainda uma redução da excreção de azoto para o meio ambiente (Oxenboll et al., 2011).

O uso de fitases tem sido alvo de um interesse considerável nos últimos anos, por promover a libertação do fósforo do ácido fítico, tornando-o disponível para ser absorvido pelo organismo dos animais. Desta maneira, reduz-se quantidade de fósforo mineral adicionado às dietas bem como a poluição ambiental (Kattak et al., 2006). Porém, a eficácia da fitase tem vindo a ser questionada recentemente. Segundo Slomninski (2011), estudos realizados mostraram que o grau de fósforo libertado não parece estar diretamente ligado à quantidade de fitase exógena adicionada. A molécula de ácido fítico é relativamente inacessível à hidrólise uma vez que se pensa formar complexos insolúveis com o cálcio, dificultando a sua degradação ao nível da parte superior do tubo digestivo. Também a atividade da fitase é comprometida pelo processo de peletização e pelas temperaturas de armazenamento, reduzindo a eficácia da sua aplicação. Assim, a adição da fitase aparenta ser benéfica em dietas com baixo teor de fósforo, melhorando a utilização dos nutrientes e a performance dos animais mas o seu efeito é menos pronunciado em dietas com o teor adequado em fósforo.

A maioria das misturas enzimáticas comerciais contém um espectro de diferentes enzimas (Marquardt et al., 1996), por forma a atuarem em diferentes substratos constituintes da dieta. Contudo, segundo Khattak et al. (2006), há que ter em conta que a taxa a que uma enzima realiza a catálise numa reação, aumenta à medida que a concentração do seu substrato é maior, até ao ponto em que deixa de haver essa resposta. Nesse momento considera-se que a enzima se encontra saturada. Daí ser muito importante que a quantidade de enzima suplementada num regime alimentar corresponda à quantidade de substrato a hidrolisar aí presente.

5. Estado de arte

As enzimas exógenas, xilanases e glucanases, foram primeiramente desenvolvidas para serem incorporadas nos regimes alimentares ricos em trigo e cevada, respetivamente, no sentido de diminuir o seu impacto negativo na performance dos animais e de aumentar a sua incorporação nas dietas.

São vários os estudos (Dusel et al., 1998; Steenfeldt et al., 1998; Gao et al., 2008; Figueiredo et al., 2012; Ribeiro et al., 2011; Józefiak et al., 2013) que evidenciam o efeito positivo da suplementação enzimática em dietas à base de trigo, cevada, centeio e outros cereais, cujo teor em diferentes PNA é elevado.

O milho é o cereal que domina o mercado ocidental da alimentação de monogástricos e, apesar das dietas à base de milho não representarem um problema no que toca à viscosidade dos conteúdos digestivos e consequentes efeitos negativos, existe um interesse considerável em identificar situações em que a adição de enzimas nestas dietas seja igualmente proveitosa. O uso isolado de xilanases e glucanases ou em simultâneo com outras enzimas, como proteases, amilases e fitases, em dietas à base de milho tem vindo a ser investigado, face ao atual aumento do preço da energia, que tem levado os produtores de rações a procurarem estratégias que lhes permitam reduzir os seus custos.

Nesse sentido, nos últimos anos, foram conduzidos alguns estudos (Zanella et al., 1999; Abudados, 2010; Abudados, 2012; Cowienson et al., 2010; Zou et al., 2013) de modo a investigar o efeito da adição de preparações convencionais de xilanases e glucanases e outras, em dietas à base de milho, nos parâmetros produtivos dos frangos de carne.

Os estudos realizados (Cowienson et al. 2010; Zou et al., 2013) mostram a eficácia da adição de xilanases e/ou glucanases em dietas à base de milho, de baixa densidade energética, quando comparadas com dietas de normal densidade energética. Por sua vez, West et al. (2007), fornecendo dietas à base de milho suplementadas com xilanase e glucanase não obteve diferenças significativas entre tratamentos. Zanella et al. (1999) mostraram que a suplementação de uma dieta à base de milho e soja com misturas enzimáticas contendo xilanase, amilase e protease promoveu um aumento da digestibilidade de nutrientes e dos parâmetros produtivos dos frangos de carne, ao mesmo tempo que permitiu reduzir a energia de formulação da dieta. Por outro lado, Troche et al. (2007), ao adicionarem xilanase, amilase e protease em dietas à base de milho e trigo, para perus, conseguiram obter melhores ganhos de peso e índices de conversão mas apenas na fase inicial da sua vida.

6. Objetivos

O benefício da utilização de xilanases e glucanases em dietas à base de milho continua pouco claro. Alguns autores defendem que as dietas constituídas única ou maioritariamente por milho e soja não beneficiam em nada na utilização de xilanases e glucanases por possuírem uma pequena quantidade de PNA na sua constituição. Por outro lado, outros autores continuam a acreditar que determinadas misturas enzimáticas podem ser benéficas.

Assim, o presente estudo pretende avaliar o efeito da adição de duas misturas enzimáticas comerciais, com diferentes composições, em dietas à base de milho, nos índices zootécnicos de frangos de carne.

Capítulo III – Materiais e Métodos

1. Preparação dos Regimes Alimentares

Para a realização deste ensaio experimental foi formulada uma dieta à base de milho, trigo e bagaço de soja, tendo todos os regimes alimentares sido preparados na fábrica de rações da Secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia.

Nos quadros seguintes (Quadros 3 e 4) encontram-se expressas a composição centesimal e nutricional dos alimentos concentrados-base de iniciação (0 - 18 dias) e crescimento (19 - 35 dias), respetivamente.

Quadro 3 - Composição centesimal e nutricional do alimento concentrado-base de iniciação (0 - 18 dias).

INICIAÇÃO		
	Ingrediente	%
Composição Centesimal	Milho	53,4
	Bagaço de Soja 48	33,5
	Trigo	5,00
	Óleo de Soja	3,47
	Fosfato Dicálcico	2,44
	Carbonato de Cálcio	0,55
	Bicarbonato de Sódio	0,32
	Cloreto de Sódio: Sal 99 %	0,18
	Metionina: DL-Metionina	0,28
	Lisina: L-Lys.HCl	0,26
	L-Treonina	0,06
	Pré-mistura ¹	0,50
Composição Nutricional	Matéria-Seca	87,3
	Amido	35,8
	Proteína Bruta	21,0
	Lisina	1,35
	Metionina	0,59
	Aminoácidos Sulfurados	0,97
	Cálcio	1,03
	Fósforo disponível	0,45
Energia Metabolizável (kcal/kg)		3000

¹Pré-mistura com a seguinte composição: Vit. A 2 000 000 U.I.; Vit. D3 630 000 U.I.; Vit. E 10 000 mg; Vit. C 8 000 mg; Vit. K3 400 g; Vit. B1 400 g; Vit. B2 1 300 mg; 1 300 mg; Vit B6 600 mg; Vit. B12 3 mg; Ác. Fólico 260 mg; Ác. Pantoténico 2 200 mg; Niacina 8 000 mg; Biotina 20 mg; Colina 120 000 mg; Zinco 17 000 mg; Ferro 6 000 mg; Cobre 2 800 mg; Manganês 18 000 mg; Iodo 200 mg; Cobalto 100 mg; Selénio 50 mg; Magnésio 13 000 mg; Bulti-hidroxitolueno 2 700 mg; Etoxiquina 2 700 mg; Monensina de sódio 20 000 mg.

Quadro 4 - Composição centesimal e nutricional do alimento concentrado-base de crescimento (19 - 35 dias).

CRESCIMENTO		
	Ingrediente	%
Composição Centesimal	Milho	48,8
	Bagaço de Soja 48	29,9
	Trigo	14,0
	Óleo de Soja	3,32
	Fosfato Dicálcico	2,05
	Carbonato de Cálcio	0,54
	Bicarbonato de Sódio	0,25
	Cloreto de Sódio: Sal 99 %	0,20
	Metionina: DL-Metionina	0,23
	Lisina: L-Lys.HCl	0,20
	Pré-mistura ¹	0,50
Composição Nutricional	Matéria-Seca	87,3
	Amido	38,2
	Proteína Bruta	19,7
	Lisina	1,21
	Metionina	0,55
	Aminoácidos Sulfurados	0,90
	Cálcio	0,90
	Fósforo disponível	0,40
Energia Metabolizável (kcal/kg)		3050

¹Pré-mistura com a seguinte composição: Vit. A 2 000 000 U.I.; Vit. D3 630 000 U.I.; Vit. E 10 000 mg; Vit. C 8 000 mg; Vit. K3 400 g; Vit. B1 400 g; Vit. B2 1 300 mg; 1 300 mg; Vit B6 600 mg; Vit. B12 3 mg; Ác. Fólico 260 mg; Ác. Pantoténico 2 200 mg; Niacina 8 000 mg; Biotina 20 mg; Colina 120 000 mg; Zinco 17 000 mg; Ferro 6 000 mg; Cobre 2 800 mg; Manganês 18 000 mg; Iodo 200 mg; Cobalto 100 mg; Selênio 50 mg; Magnésio 13 000 mg; Bulti-hidroxitolueno 2 700 mg; Etoxiquina 2 700 mg; Monensina de sódio 20 000 mg.

Os micro-ingredientes (fosfato dicálcico, carbonato de cálcio, bicarbonato de sódio, metionina, lisina, treonina, cloreto de sódio) foram pesados e misturados num recipiente à parte. As misturas enzimáticas foram pesadas e adicionadas à pré-mistura previamente pesada e posteriormente esta mistura foi adicionada aos restantes micro-ingredientes. Seguidamente, esta mistura final foi adicionada no misturador, utilizando parte do milho como excipiente. Os macro-ingredientes, milho, trigo e bagaço de soja, foram moídos e colocados na misturadora. Por fim, foi adicionado o óleo de soja. Os ingredientes foram sujeitos a um processo de mistura durante 10 minutos e, seguidamente, colocados em caixas de plástico.

Ao todo, foram produzidos 700 kg de alimento de iniciação e 2000 kg de alimento de crescimento, tendo em conta as quantidades diárias ingeridas pela estirpe ROSS 308 e possíveis desperdícios.

O alimento concentrado-base foi formulado de modo a ser similar aos regimes alimentares comerciais padrão, produzidos industrialmente, para frangos de carne.

Após o alimento concentrado-base de iniciação e de crescimento ter sido produzido, foi sujeito a uma análise química, para confirmação dos valores da sua composição. No quadro 5 apresentam-se os resultados.

Quadro 5 - Resultados da análise à composição química do alimento concentrado base de iniciação e de crescimento.

Parâmetro	Alimento de iniciação (%)	Alimento de crescimento (%)
<i>Proteína Bruta</i>	20,30	18,9
<i>Matéria Gorda</i>	6,70	5,8
<i>Celulose</i>	2,60	2,7
<i>Cálcio</i>	0,97	0,79

2. Tratamentos

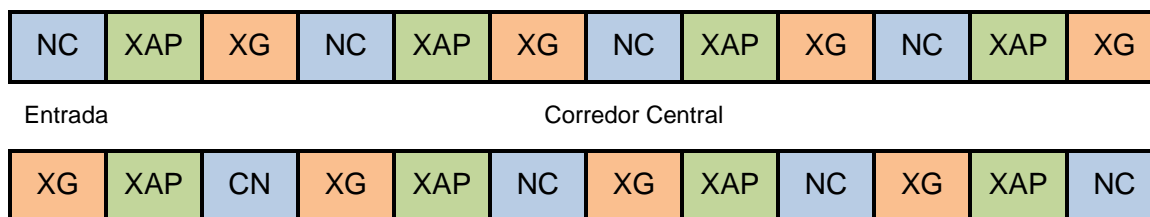
Para este estudo consideraram-se 3 tratamentos diferentes: o Controlo Negativo (CN) que consistia no alimento concentrado-base, isento de suplementação enzimática; o tratamento XAP, em que se adicionou 0,025 % da mistura enzimática XAP ao alimento concentrado base e; o tratamento XG que continha 0,005 % da mistura enzimática XG no alimento concentrado base.

A mistura enzimática comercial XAP possuía uma atividade mínima garantida de 9200 U/g de endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8), 16000 U/g de protease subtilisina (EC 3.4.21.62) e 1600 U/g de α -amilase (EC 3.2.1.1). No caso da mistura enzimática comercial XG a atividade mínima garantida era de 1400 AXC/g de endo-1,4- β -xilanase (EC 3.2.1.8) e 2000 AGL/g de endo-1,3(4)- β -glucanase (EC 3.2.1.6).

Para os tratamentos XAP e XG, a respetiva dosagem de enzima respeitou os valores comerciais recomendados, em ambos os regimes de iniciação e de crescimento.

Efetuaram-se 8 repetições para cada tratamento, distribuídos de forma uniforme pela sala, como mostra a figura (Figura 1), permitindo a minimização do efeito das condições ambientais na performance dos animais.

Figura 5 - Distribuição dos tratamentos CN, XAP e XG pelos parques.



O regime de iniciação foi distribuído aos animais desde o início do ensaio até ao dia 18, seguindo-se o fornecimento do regime de crescimento (dia 19 - 35), para todos os tratamentos.

3. Animais e Instalações

O ensaio experimental teve lugar nas instalações do Agrupamento Funcional de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia, numa sala de ambiente controlado (Temperatura e Humidade Relativa) durante um período de 35 dias. O ensaio experimental foi conduzido de acordo com as diretrizes da União Europeia (Council Directive 86/609/EEC).

A sala é constituída por 24 parques, cada um apresentando uma área de 2,025 m², 4 bebedouros do tipo pipeta, um comedouro suspenso e uma lâmpada de aquecimento. Durante a primeira semana de ensaio, para facilitar o acesso ao alimento pelos animais, cada parque dispunha também de um tabuleiro de primeira idade que foi colocado no chão.

Antes da chegada dos animais, a sala sofreu um processo de limpeza e desinfecção (vazio sanitário). O chão de cada parque foi revestido com aproximadamente 10 cm de raspa de madeira, o alimento foi disposto nos comedouros e a sala foi aquecida até aos 28-29 °C, com a utilização de 5 aquecedores colocados de forma equidistante ao longo do corredor central, permitindo uma temperatura uniforme em toda a instalação.

Foram adquiridos 700 pintos do dia, machos, da estirpe ROSS 308 para a realização deste estudo, dos quais foram selecionados 648 animais. Estes foram pesados individualmente, identificados através de um anilha colocada na asa e distribuídos aleatoriamente, em grupos de 27 aves, por cada um dos 24 parques. Para garantir uma maior homogeneidade inicial de pesos do bando e de cada parque em

particular, animais com pesos inferiores a 35 g e superiores a 60 g não foram admitidos no ensaio.

Ao 19º dia de ensaio, os dois animais mais pesados de cada parque foram abatidos para recolha dos conteúdos digestivos e respetiva análise da viscosidade. Assim, do 19º ao 35º dia, o estudo prosseguiu com 25 animais em cada parque (600 animais).

A densidade animal durante o período de iniciação foi de 0,075 m²/ave (0 - 19 dias) e 0,081 m²/ave (19 - 35 dias) no período de crescimento, respeitando a Diretiva 2007/43/CE do Conselho de 28 de Junho de 2007, relativa ao estabelecimento de regras mínimas para a proteção de frangos de carne (<33 kg/m²).

Durante todo o ensaio, os animais foram alimentados *ad libitum* e, para garantir a disponibilidade de alimento, o nível de alimento foi verificado duas vezes por dia. O alimento foi fornecido e registado diariamente, efetuando-se a pesagem do refugo no final de cada semana, permitindo a determinação da ingestão média semanal. Por sua vez, todos os animais foram pesados semanalmente (dias 0, 7, 14, 21, 28 e 34), de forma a ser possível calcular o ganho médio (GM) e o índice de conversão (IC) semanais. Foram também pesados no dia de mudança do regime de iniciação para o de crescimento, para poder calcular o GM e o IC de cada período.

A mortalidade foi também verificada diariamente e os animais mortos foram pesados e registados.

A altura dos bebedouros, comedouros e lâmpadas de aquecimento foi sendo ajustada ao longo do tempo, acompanhando o crescimento dos animais. A temperatura e a humidade da sala foram controladas diariamente através do aquecimento/ventilação de acordo com os requerimentos da estirpe utilizada e de acordo com o comportamento dos animais. Este controlo foi efetuado desde o primeiro dia até ao final do ensaio.

No final do estudo experimental (dia 35), os dois animais mais pesados de cada um dos parques foram abatidos. Tanto no dia 19 como no dia 35, os animais foram atordoados com 90 V e abatidos por deslocamento cervical, para recolha dos conteúdos digestivos do duodeno, jejuno e íleo e determinação das respetivas viscosidades. Ao dia 35, efetuou-se ainda a recolha dos conteúdos digestivos do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo e ceco para posterior análise de atividade enzimática, bem como a pesagem do papo, moela, fígado, pâncreas, duodeno, jejuno, íleo e cecos e a medição do comprimento do duodeno, jejuno, íleo e ceco. Os compartimentos

foram esvaziados dos seus conteúdos antes da determinação do seu peso e/ou comprimento.

4. Análises Laboratoriais

Ensaio enzimático

Para avaliar a ação individual de cada uma das misturas enzimáticas comerciais, utilizadas neste estudo experimental, sobre diferentes substratos, realizou-se um ensaio enzimático.

De forma a proceder à extração das enzimas de cada uma das misturas enzimáticas, pesaram-se 0,75 g de cada mistura comercial em microtubos, adicionando-se 1 ml de solução tampão PC em cada um. Sofreram uma agitação durante 30 minutos, a 37 °C, para de seguida se centrifugar e retirar o sobrenadante.

O ensaio enzimático foi elaborado de acordo com o método colorimétrico de DNSA, adaptado de Miller (1959). O volume total de reação foi de 600 µl, contendo 590 µl de substrato a 0,3 %, pré-aquecido a 40 °C, e 10 µl do sobrenadante da respetiva enzima comercial. Foi elaborado inicialmente um ensaio preliminar de forma a determinar a diluição mais apropriada para cada mistura enzimática. Após determinar que seria utilizada a diluição de 1/5000 para cada uma das misturas enzimáticas, procedeu-se ao ensaio enzimático onde foram testados os seguintes substratos: liquenano, xiloglucano, arabinoxilano do centeio, arabinoxilano do trigo, beta glucano e xilano solúvel.

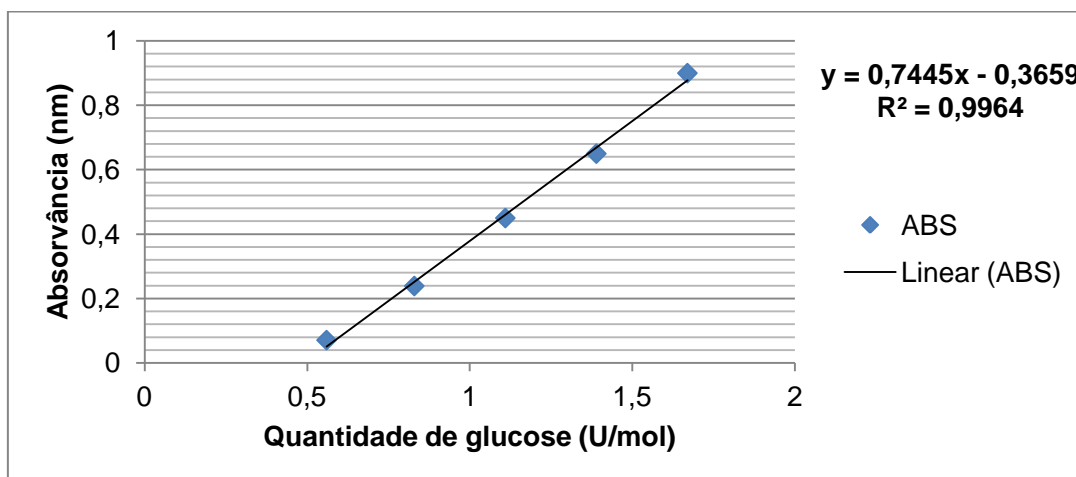
As reações incubaram a 40 °C, durante 30 e 60 minutos, para que as enzimas atuassem sobre o substrato.

Passado o tempo considerado, para parar a reação, adicionou-se ao volume de reação 600 µl de DNSA (1 % DNSA (3,5 - *Dinitro Salicylic acid*), 0,2 % de fenol, 1 % de NaOH), onde foi previamente adicionado 100 µl de sulfito de sódio a 5 % e 2 µl de glucose a 20 %. Seguidamente, os tubos sofreram uma fervura durante 15 minutos e um repouso de 5 minutos em gelo, para depois ser sujeita a uma centrifugação de 1 minuto a 16000 rcf. Procedeu-se à leitura da absorvância dos sobrenadantes a 575 nm num espectofotómetro *ultrospec 3100 pro*, *Amersham biosciences*.

Como a quantidade de glucose libertada por minuto é diretamente proporcional ao valor de ABS lido, o seu valor é obtido através de uma reta de calibração que foi elaborada previamente ao ensaio: $y = 0,7445x - 0,3659$, de $R^2 = 0,9964$.

Para a obtenção da reta de calibração, soluções com quantidades conhecidas de glucose são sujeitas a uma leitura da absorvância respetiva.

Figura 6 - Curva padrão utilizada para estimar a quantidade de glucose libertada durante a ação enzimática, através do valor de absorvância.



Atividade enzimática dos conteúdos digestivos e do alimento

Para a avaliação da atividade enzimática, as amostras dos conteúdos digestivos dos diversos compartimentos gastrointestinais, recolhidos em microtubos, sofreram uma centrifugação a 16100 rcf, durante 5 minutos, tendo-se recolhido posteriormente o sobrenadante. Foram preparados dois meios de cultura diferentes: um com 0,1 % (p/v) de arabinosilano (*Megazyme*) e outro com 0,1 % (p/v) de β -glucano (*Megazyme*), ambos numa solução de 2 % (p/v) de agar (*Melford*) em 10 mM de tris a pH 8 (*Sigma Trizma base*, *Tris[hydroxymethyl]amino-methane*). Estes dois meios, após homogeneização e esterilização por autoclave, foram colocados em placas de Petri. Após solidificação dos meios nas placas, foram feitos pequenos poços, devidamente identificados, utilizando pipetas de Pasteur, para depósito de 20 μ L de sobrenadante das amostras dos vários compartimentos gasto-intestinais acima referidos. Seguidamente as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e foram depois coradas com Vermelho do Congo numa concentração final de 1 % (p/v) em 10 mM de tris-HCl a pH 8, durante 20 minutos. Para retirar o excesso de corante, efetuaram-se lavagens com uma solução descorante de NaCl 1 M em 10 mM de tris a pH 8, em intervalos de 15 minutos. Para leitura dos resultados e registo fotográfico, as placas foram colocadas sobre um transiluminador de luz visível. As regiões em torno dos poços onde houve degradação apresentaram-se descoradas em relação à cor vermelha da placa.

Também foi avaliada a atividade enzimática basal do alimento fornecido. Para tal, pesou-se 0,75 g do alimento CN, XAP e XG e colocou-se em microtubos

previamente identificados, adicionando-se a cada um 1000 µL de solução tampão PC. Antes de serem colocados numa incubadora a 37 °C e 200 rpm, durante 30 minutos, sofreram ainda uma agitação prévia no vortex. Seguidamente, centrifugou-se cada um dos microtubos a 16100 rcf, durante 5 minutos, para se retirar o sobrenadante. Foram colocados 20 µL de sobrenadante de cada um dos alimentos em poços dos dois meios diferentes, acima referidos, dispostos em placas de Petri. Estas placas foram sujeitas a uma incubação a 37 °C, durante 36 horas, tendo também sido sujeitas à mesma metodologia acima descrita.

Viscosidade dos conteúdos digestivos

Após o abate dos frangos, foram recolhidas amostras dos conteúdos digestivos para que, de seguida, fosse determinada a sua viscosidade.

As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 10867 rcf, durante 10 minutos, tendo-se depois recolhido o sobrenadante, do qual se mediu a viscosidade.

A viscosidade foi obtida através de leitura direta de um viscosímetro *Brookfield viscometer (Model LVDVCP-II)*, *Brookfield Engineering Laboratories Middleboro, MA*, acoplado a um banho maria que manteve as amostras a uma temperatura constante de 25 °C.

5. Análise Estatística

A análise estatística foi efetuada recorrendo à análise de variância usando o procedimento General Linear Models do programa estatístico SAS (SAS, 2001). Médias com valor de F significativos ($P < 0,05$) foram comparadas usando o teste de Duncan. Diferenças entre médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Também se recorreu ao teste do Qui-quadrado para a análise qualitativa das atividades enzimáticas usando o programa SAS (SAS, 2001).

Capítulo IV – Resultados

1. Performances Zootécnicas

1.1. Peso Vivo

O peso vivo (PV) dos animais foi registado no início (dia 0) e semanalmente (dia 7, 14, 21, 28 e 34) até ao final do ensaio. Nos quadros seguintes encontram-se os valores referentes às médias de PV registadas por tratamento, ao longo das 5 semanas de estudo (quadro 6) e, separadamente, durante o período de iniciação e de crescimento (quadro 7). A unidade experimental utilizada foi a gaiola (n=8).

Quadro 6 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no peso vivo de frangos de carne (g).

Dias	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
0 d	41,6	41,9	41,9	0,12	0,597
7 d	146,7 ^b	150,9 ^a	146,9 ^b	0,65	0,013
14 d	424,1 ^{ab}	431,9 ^a	420,1 ^b	1,71	0,016
21 d	841,9 ^b	857,4 ^a	840,6 ^b	3,13	0,050
28 d	1431,2	1449,4	1420,9	5,92	0,136
34 d	1946,7	1973,9	1943,3	8,23	0,250

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

^{a-b} Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

Pela observação dos valores, verifica-se que no dia 0 o PV dos pintos do dia distribuídos pelos 3 tratamentos não difere, não havendo vantagem inicial para nenhum dos tratamentos. Aos 7 e 21 dias de idade, o PV dos animais sujeitos ao tratamento XAP é superior (P<0,05) ao dos outros tratamentos. Aos 14 de idade, o PV dos animais submetidos ao tratamento XAP é superior ao PV dos animais sujeitos ao tratamento XG, mas não difere dos resultados obtidos para o CN.

Nas pesagens dos dias 28 e 34, não se encontram diferenças entre tratamentos ao nível do PV (P>0,05).

Quadro 7 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no peso vivo de frangos de carne (g), durante o período de iniciação (0 - 19 dias) e de crescimento (19 - 34 dias).

Dias	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
0 d	41,6	41,9	41,9	0,122	0,597
19 d	715,9 ^{ab}	726,9 ^a	711,7 ^b	2,904	0,087
34 d	1946,7	1973,9	1943,3	8,230	0,250

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

^{a - b} Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,1).

Durante o período de iniciação, os animais sujeitos ao tratamento XAP possuem PV superiores (P<0,05) aos dos animais sujeitos ao tratamento XG mas não diferem dos valores obtidos para CN.

No período de crescimento não existem diferenças entre os 3 tratamentos (P>0,05).

1.2. Alimento Ingerido

O alimento adicionado diariamente aos comedouros foi registado e o seu refugo pesado no final de cada semana. Dessa forma foi possível calcular a ingestão semanal de cada parque e, portanto, a ingestão média individual. Nas quadros seguintes apresentam-se os dados correspondentes às ingestões médias individuais de cada semana (quadro 8) e do período de iniciação e de crescimento (quadro 9), por tratamento. A unidade experimental utilizada foi a gaiola (n=8).

Quadro 8 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na quantidade de alimento ingerido (g/ave).

Tratamento ¹				SEM	p(F)
Dias	CN	XAP	XG		
0 - 7 d	156,1	155,0	149,4	2,034	0,372
7 - 14 d	357,3	361,1	352,3	1,848	0,153
14 - 21 d	628,9	640,4	633,6	3,248	0,364
21 - 28 d	948,8	952,9	943,3	7,332	0,875
28 - 34 d	963,5	965,5	960,6	7,330	0,967
0 - 34 d	3683,5	3715,2	3672,8	18,635	0,647

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

Ao nível da ingestão de alimento não se verificam diferenças entre tratamentos (P>0,05).

Quadro 9 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na quantidade de alimento ingerido (g/ave), durante o período de iniciação (0 - 19 dias) e de crescimento (19 - 34 dias).

Tratamento ¹				SEM	p(F)
Dias	CN	XAP	XG		
0 - 19 d	933,4	941,4	922,4	5,175	0,336
19 - 34 d	2750,2	2773,8	2750,4	16,453	0,788

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

Em conformidade com o quadro 8, a ingestão de alimento não foi diferente entre tratamentos (P>0,05) nem durante o período de iniciação nem de crescimento.

1.3. Índice de Conversão

O índice de conversão (IC) consiste na relação entre o aumento de peso vivo e a quantidade de alimento ingerido.

Os valores relativos aos IC calculados para cada semana (quadro 10), para o período de iniciação, crescimento e total (quadro 11) são apresentados seguidamente. A unidade experimental utilizada foi a gaiola (n=8).

Quadro 10 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no índice de conversão dos animais.

Dias	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
0 - 7 d	1,52	1,45	1,45	0,010	0,009
7 - 14 d	1,31	1,30	1,30	0,006	0,865
14 - 21 d	1,55	1,54	1,52	0,012	0,623
21 - 28 d	1,63	1,64	1,64	0,011	0,945
28 - 34 d	1,89	1,90	1,89	0,015	0,964
0 - 34 d	1,95	1,95	1,95	0,009	0,986

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.^{a-b} Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

Os valores de IC dos animais cuja alimentação foi suplementada com misturas enzimáticas (XAP e XG) são inferiores relativamente aos do CN (P<0,05), apenas durante a primeira semana de ensaio (0 - 7 dias). Não se verificam mais diferenças nos IC entre tratamentos (P>0,05) nos restantes períodos.

Quadro 11 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no índice de conversão dos animais, durante o período de iniciação (0 - 19 dias) e de crescimento (19 - 34 dias).

Dias	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
0 - 19 d	1,42	1,39	1,39	0,007	0,100
19 - 34 d	2,25	2,25	2,26	0,013	0,965

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

Apesar das diferenças encontradas durante a primeira semana de ensaio, de uma forma global o IC do período de iniciação não difere entre tratamentos. Quanto ao período de crescimento, tal como constatado no quadro 11, não se verificam diferenças entre tratamentos.

2. Viscosidade dos conteúdos digestivos

A viscosidade dos conteúdos digestivos, recolhidos após o abate das aves, foi determinada diretamente através do viscosímetro.

Os quadros abaixo indicados contêm os resultados obtidos aos 19 (quadro 12) e aos 35 dias de idade (quadro 13).

Quadro 12 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na viscosidade dos conteúdos digestivos (em cpo) aos 19 dias de idade (fim do período de iniciação).

Compartimento	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
Duodeno+Jejuno	5,51	5,03	5,24	0,184	0,569
Íleo	8,35 ^a	6,61 ^b	7,53 ^{ab}	0,295	0,050

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

^{a-b} Valores presentes na mesma linha associados a letras diferentes são significativamente diferentes (P < 0,05).

A viscosidade do conteúdo digestivo do duodeno e jejuno não difere entre tratamentos aos 19 dias de idade ($P>0,05$). Por outro lado, a viscosidade do conteúdo digestivo do íleo dos animais submetidos ao tratamento XAP é inferior relativamente ao verificado para o tratamento CN, mas não difere do tratamento XG ($P<0,05$).

Quadro 13 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na viscosidade do conteúdo digestivo (em cpo) aos 35 dias de idade (fim do período de crescimento).

Compartimento	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
<i>Duodeno+Jejuno</i>	5,02	4,94	4,95	0,161	0,976
<i>Íleo</i>	5,91	5,64	5,91	0,154	0,725

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

Aos 35 dias de idade, não se observam diferenças ($P>0,05$) na viscosidade do conteúdo digestivo entre tratamentos, nem no caso do duodeno e jejuno nem do íleo.

3. Dimensões dos órgãos do tubo digestivo

Após o abate, retirou-se na totalidade o digesta do papo, moela, duodeno, jejuno, íleo e cecos, que foram seguidamente lavados e secos para que se pudesse pesá-los. Também se determinou o peso do fígado e pâncreas. O comprimento do duodeno, jejuno, íleo e ceco foi igualmente registado.

Os valores apresentados nos quadros seguintes são valores relativos ao peso vivo do respetivo animal (quadro 14 e 15).

Quadro 14 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo no peso relativo dos órgãos do tubo digestivo (g/kg PV).

Compartimento	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
Papo	2,58	2,61	2,49	0,092	0,864
Moela	12,14	12,97	12,82	0,262	0,388
Fígado	33,18	31,32	32,98	0,5200	0,281
Pâncreas	2,21	2,24	2,13	0,058	0,727
Duodeno	5,62	5,65	5,55	0,126	0,944
Jejuno	10,57	10,77	10,35	0,182	0,655
Íleo	9,65	9,24	9,83	0,219	0,542
Ceco	3,48	3,73	3,73	0,105	0,553

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

A observação dos valores presentes no quadro 14 permite afirmar que os pesos relativos dos órgãos do tubo digestivo não são diferentes entre tratamentos ($P>0,05$).

Quadro 15 - Efeito da suplementação enzimática em dietas à base de milho e trigo na dimensão relativa dos órgãos do tubo digestivo (cm/kg PV).

Compartimento	Tratamento ¹			SEM	p(F)
	CN	XAP	XG		
Duodeno	13,51	13,67	13,68	0,191	0,917
Jejuno	32,54	33,24	32,51	0,507	0,807
Íleo	34,74	34,06	35,10	0,587	0,773
Ceco	7,97	7,93	8,01	0,164	0,982

¹ CN representa o regime base sem suplementação enzimática; XAP trata-se do regime base com a adição de 0,025 % da mistura enzimática XAP; XG é alimento concentrado base contendo 0,005 % da mistura enzimática XG.

Também para os comprimentos relativos não se constata diferenças entre tratamentos ($P>0,05$).

4. Atividade enzimática das misturas comerciais de enzimas

Depois de aplicada a reta de calibração aos resultados obtidos no ensaio enzimático, os valores foram expressos em unidades enzimáticas - U (quantidade de açúcar simples libertado por minuto de reação) por grama de mistura enzimática.

As atividades mínimas, presentes nas fichas técnicas das misturas enzimáticas comerciais utilizadas no ensaio, encontram-se expressas em unidades diferentes, não sendo possível uma fácil comparação quantitativa entre misturas. Assim, realizou-se um ensaio enzimático com o objetivo de obter as atividades enzimáticas das duas misturas comerciais utilizadas, perante diferentes tipos de hidratos de carbono que constituíam substratos individuais e puros.

No quadro 16 encontram-se os valores alcançados.

Quadro 16 - Atividade enzimática (U/g enzima) verificada em amostras das duas misturas enzimáticas comerciais utilizadas (XAP e XG) perante diferentes substratos.

Substrato	XAP (U/g enzima)	XG (U/g enzima)
<i>Liquenano</i>	n.d. ¹	15575,46
<i>Xiloglucano</i>	n.d. ¹	8844,47
<i>AX do centeio</i>	14817,37	12374,61
<i>AX do trigo</i>	12244,43	9380,50
<i>β-glucano</i>	n.d. ¹	14916,92
<i>Xilano solúvel</i>	8339,08	n.d. ¹

¹ - atividade enzimática não detetável.

O complexo enzimático comercial XAP apresentou uma elevada atividade enzimática para o arabinoxilano do centeio e do trigo e para o xilano solúvel. Não apresentou qualquer atividade enzimática perante substratos como o β-glucano e xiloglucano.

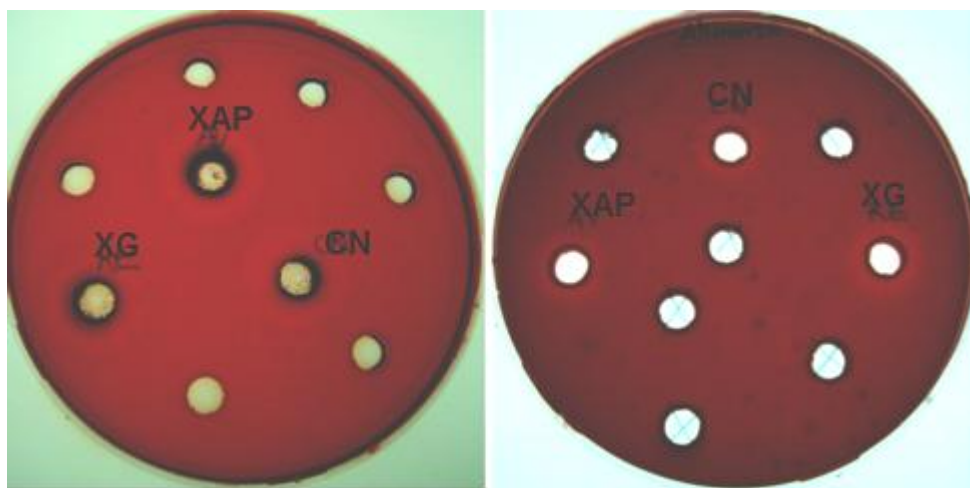
Por outro lado, a mistura comercial XG apresenta atividade enzimática para todos os substratos testados, observando-se uma maior atividade para o liquenano e β-glucano. Para substratos como o arabinoxilano do centeio e do trigo, a mistura comercial XAP apresenta valores superiores que XG.

5. Avaliação da atividade enzimática dos conteúdos digestivos e dos regimes alimentares

Após a observação dos halos gerados pela atividade enzimática dos três regimes alimentares (Figura 7) e dos conteúdos digestivos dos animais (Figura 8 e 9), procedeu-se à elaboração de quadros onde consta uma avaliação qualitativa para cada um dos substratos, arabinosilano do trigo (quadro 17) e β -glucano (quadro 18).

Na figura 7 encontra-se a atividade enzimática basal do alimento, tendo o arabinosilano como substrato (à esquerda) e o β -glucano (à direita).

Figura 7 - Atividade enzimática basal do alimento correspondente aos três tratamentos: CN, XAP e XG.



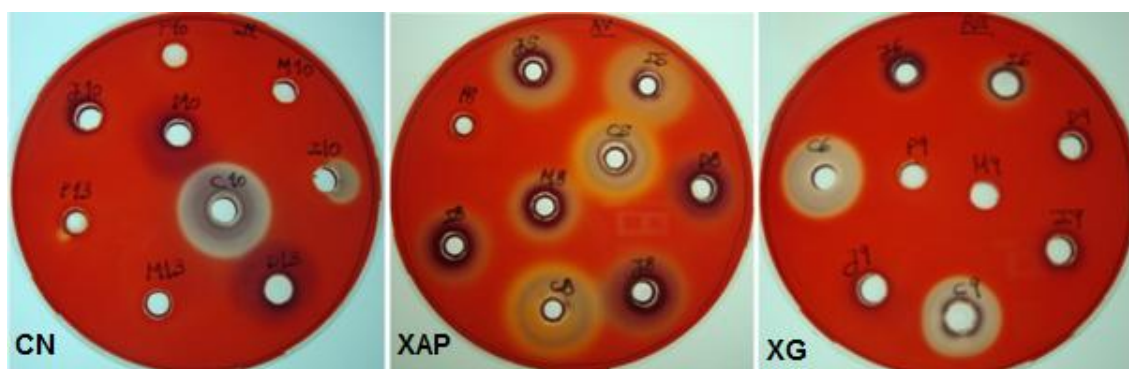
Para ambos os meios, verifica-se atividade enzimática em todos os poços. Contudo, para a placa contendo arabinosilano como substrato, a atividade enzimática é mais evidente para XAP e, para a placa contendo β -glucano como substrato, a atividade enzimática é mais acentuada para XG.

Quadro 17 - Avaliação da atividade xilanásica no alimento e nas amostras dos conteúdos digestivos ¹

Substrato ARABINOXILANO				
	CN	XAP	XG	Q ²
<i>Alimento</i>	±	+	±	
Papo	(-, -, +, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, +)	(+, +, -, -, -, -, +)	0,135
Moela	(-, -, +, -, -, +, -, +)	(+, +, +, -, -, -, -, +)	(-, -, -, -, -, -, +)	0,269
Duodeno	(-, -, +, -, -, +, +, -)	(+, +, +, -, -, +, +, -)	(+, +, -, -, -, +, -, +)	0,607
Jejuno	(+, +, +, -, -, -, -, -)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	(+, +, -, -, -, +, -, -)	0,024
Íleo	(-, +, +, -, +, +, +, -)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	(+, +, -, +, -, +, -, -)	0,073
Ceco	(+, +, +, +, +, +, +, +)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	-

¹ A cada linha correspondem os resultados da atividade enzimática de cada região do tubo digestivo, 8 animais por tratamento. A atividade enzimática foi classificada em existente (+), não existente (-) e pouco expressiva (±).

Figura 8 - Exemplo da técnica utilizada para avaliar a atividade xilanásica dos conteúdos digestivos de dois animais do tratamento CN, de dois animais do tratamento XAP e de outros dois do tratamento XG, em que P=papo, M=moela, D=duodeno, J=jejuno, I=íleo e C=ceco.



A atividade enzimática nos papos é pouco evidente para todos os tratamentos, tal como acontece na moela. Verifica-se uma maior atividade enzimática, para todos os tratamentos, a partir do duodeno, sendo mais acentuada no caso do tratamento XAP. Os cecos apresentaram atividade enzimática em todos os tratamentos.

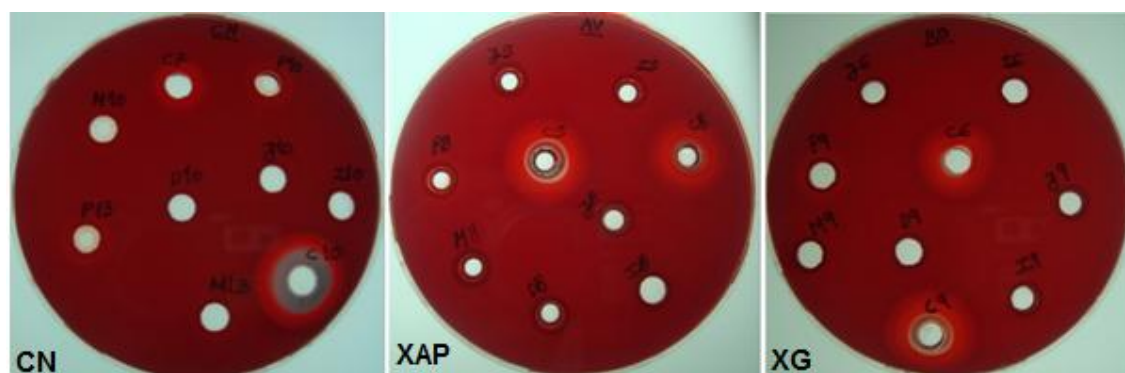
Os resultados da análise Qui-quadrado mostram uma diferença significativa no jejuno, o que indica que neste compartimento o tratamento XAP influenciou a atividade xilanásica ($P < 0,05$). A atividade xilanásica também apresenta uma tendência para a significância no íleo ($P < 0,1$).

Quadro 18 - Avaliação da atividade glucanásica no alimento e nas amostras dos conteúdos digestivos ¹.

Substrato β -GLUCANO				
	CN	XAP	XG	Q ²
<i>Alimento</i>	\pm	\pm	+	-
Papo	(+, -, +, +, +, -, -, -)	(+, +, +, +, -, +, +, +)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	0,123
Moela	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, +)	0,352
Duodeno	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, -)	-
Jejuno	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, -)	-
Íleo	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, -, -, -, -)	(-, -, -, -, +, -, +)	0,113
Ceco	(+, +, +, +, +, +, +, +)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	(+, +, +, +, +, +, +, +)	-

¹ A cada linha correspondem os resultados da atividade enzimática de cada região do tubo digestivo, 8 animais por tratamento. A atividade enzimática foi classificada em existente (+), não existente (-) e pouco expressiva (\pm).

Figura 9 - Exemplo da técnica utilizada para avaliar a atividade glucanásica dos conteúdos digestivos de dois animais do tratamento CN, de dois animais do tratamento XAP e de outros dois do tratamento XG, em que P=papo, M=moela, D=duodeno, J=jejuno, I=íleo e C=ceco.



Os papos apresentaram atividade glucanásica em todos os 8 animais do tratamento XG, em 7 animais do tratamento XAP e em 5 do tratamento CN. À exceção de um único animal do tratamento XG, não houve evidências de atividade enzimática na moela, duodeno, jejuno e íleo para nenhum dos tratamentos. Os cecos apresentaram atividade enzimática em todos os tratamentos.

Os resultados da análise Qui-quadrado mostram que não houve influencia do tratamento na atividade glucanásica ($P > 0,05$), para nenhum dos compartimentos.

Capítulo V – Discussão

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito conjunto de glucanases e xilanases ou xilanases, amilases e proteases em dietas comerciais à base de milho e trigo, de densidade energética adequada, nos parâmetros produtivos de frangos de carne. Vários estudos (Dusel et al., 1998; Steenfeldt et al., 1998; Gao et al., 2008; Figueiredo et al., 2012) já demonstraram a eficácia da adição de xilanases em dietas à base de trigo na redução da viscosidade dos conteúdos digestivos e na melhoria da digestão e absorção de nutrientes, com consequentes efeitos positivos nos diversos parâmetros produtivos. Também a suplementação de dietas à base de cevada com glucanases tem conduzido a melhores resultados nos parâmetros produtivos dos frangos de carne (Ribeiro et al., 2011; Józefiak et al., 2013). No entanto, uma maior relevância deve ser dada aos efeitos destas enzimas em dietas à base de milho.

Os resultados apresentados no capítulo anterior mostraram que durante a fase de iniciação (0 - 21 dias), verificou-se que o PV dos animais sujeitos ao tratamento XAP, cujas dietas haviam sido suplementadas com xilanase, amilase e protease, foi superior ao dos outros tratamentos. Porém na fase de crescimento não se verificaram diferenças entre tratamentos. Os dados referentes ao tratamento XAP são semelhantes aos obtidos por Troche et al. (2007) num estudo realizado com perus, em que foi fornecida uma dieta à base de milho e trigo, suplementada com xilanase, amilase e protease. Os aumentos de peso vivo foram superiores para os animais cujas dietas de menor densidade energética haviam sido suplementadas, quando comparadas com o controlo positivo (Troche et al., 2007). Contudo, também esses resultados só se observaram na fase de iniciação (0 - 21 dias), não havendo diferenças significativas na fase de crescimento (21 - 56 dias). Também Yu et al. (2007) obtiveram ganhos de peso superiores, durante o período de iniciação (0 - 21 dias), para dietas de milho suplementadas com xilanase, amilase e protease quando comparadas com dietas não suplementadas, mas apenas no ensaio desenvolvido durante a época quente. Não houve diferenças significativas entre tratamentos durante a época fria. Por outro lado, Zanella et al. (1999) obtiveram ganhos de peso globais superiores para os animais cujas dietas à base de milho eram de menor densidade energética e foram suplementadas com uma mistura enzimática contendo xilanase, amilase e protease.

No presente estudo, os animais alimentados com o regime XG, com incorporação de glucanase e xilanase, obtiveram PV semelhantes ao CN. Por outro lado, Cowieson et al. (2010), referem que no seu estudo, dos 0 aos 21 dias de idade, a

adição de xilanase e/ou glucanase a dietas à base de milho, de menor densidade energética, permitiu a obtenção de pesos vivos iguais aos obtidos para a dieta de controlo positivo, de maior densidade energética mas sem suplementação. Porém, no período de crescimento, dos 21 aos 42 dias de idade, também não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos. Por sua vez, no estudo de West et al. (2007), a incorporação de glucanase e xilanase em dietas à base de milho, de densidade energética normal, não conduziu a diferenças significativas entre tratamentos.

Os resultados aqui apresentados sugerem que a adição de enzimas a dietas à base de milho poderá ter um efeito mais vantajoso em aves jovens uma vez que o seu sistema digestivo não está ainda bem desenvolvido, especialmente o epitélio intestinal, onde se dá a absorção dos nutrientes, tal como propõe Troche et al. (2003). A produção de certas enzimas endógenas é também deficitária no início de vida (Gracia et al., 2003). Segundo Noy et al. (1997), o pico de secreção de tripsina ocorre aos 4 dias de idade e o de amilase aos 7 dias de idade, pelo que uma mistura enzimática contendo amilase, xilanase e protease, como é o caso da adicionada ao tratamento XAP, promoverá mais facilmente a quebra das ligações do amido, das paredes celulares e ainda das proteínas inacessíveis (Troche et al., 2007), permitindo maiores pesos vivos para os animais mais jovens, tal como verificado no presente ensaio.

A quantidade de alimento ingerido não foi diferente entre tratamentos ao longo de todo o presente ensaio. A presença de arabinoxilanos e β -glucanos na dieta induz um aumento da viscosidade dos conteúdos digestivos e, conseqüentemente, abranda a sua taxa de passagem ao longo do tubo digestivo (Bedford, 2000). A adição de xilanases e β -glucanases, reduz essa viscosidade, aumentando a velocidade de passagem do alimento ao longo do tubo digestivo. Assim seria de esperar que a quantidade de alimento ingerido fosse maior para os animais sujeitos a dietas suplementadas. Contudo, como o milho apresenta uma concentração muito baixa em polissacáridos não amiláceos solúveis, os problemas de viscosidade não são recorrentes (Gracia et al., 2003). Outros estudos envolvendo a adição de xilanase, amilase e protease a dietas à base de milho (Yu et al., 2004; Cowieson et al., 2008) referiram que não houve influência entre o tratamento ou densidade energética do alimento na quantidade ingerida pelos animais. Cowieson et al. (2010) também obtiveram valores de ingestão de alimento que não diferiam estatisticamente, perante a suplementação de dietas à base de milho com glucanase e xilanase.

Os benefícios da incorporação de enzimas incluem um aumento da digestão e absorção de nutrientes, o que resulta num aumento da eficiência alimentar, com uma

diminuição do IC (Khattak et al., 2006). Apesar disso, não se verificaram diferenças entre tratamentos para os IC, durante o período de iniciação nem durante o período de crescimento, o que está de acordo com os resultados obtidos para o ganho médio e ingestão médias dos animais. Yu et al. (2007) também obtiveram IC semelhantes entre tratamentos, ao adicionarem xilanase, amilase e protease em dietas à base de milho. Por sua vez, Cowieson et al. (2010) referem que durante todo o período de iniciação, dos 0 aos 21 dias de idade, os IC dos animais que tinham ingerido dietas suplementadas com doses baixas de xilanase e/ou glucanase, foram inferiores aos dos restantes tratamentos, exceto do controlo positivo. Do período dos 21 aos 42 dias de idade, os IC dos animais alimentados com controlo positivo não foi estatisticamente diferente aos de todos os animais cujas dietas haviam sido suplementadas (Cowieson et al., 2010).

A viscosidade dos conteúdos digestivos é um problema muito relevante para dietas à base de cevada ou centeio e menos para as dietas à base de trigo, sendo mínima no caso do milho. Isto deve-se ao tipo de fibras solúveis e ao tamanho das suas cadeias ser muito menor no caso do milho do que nos outros grãos de cereais. A existência de PNA solúveis com cadeias suficientemente grandes leva à formação de um gel viscoso na fase aquosa intestinal. Quanto maior for a quantidade e o tamanho das cadeias dos PNA solúveis, mais viscoso será o gel formado (Bedford, 2008). Este dificulta a interação entre substratos e enzimas digestivas e diminui a taxa de difusão dos nutrientes através da superfície da mucosa intestinal (Choct, 1997). As enzimas que são adicionadas às dietas que contém cereais ricos em PNA tal como a cevada, o centeio e o trigo, reduzem significativamente a viscosidade da dieta (Khattak et al., 2006). Ao provocarem a quebra das grandes moléculas de PNA em polímeros menores, diminuem a sua afinidade para a água e reduzem a viscosidade dos conteúdos intestinais (Choct, 1997). Assim, há uma melhor digestão e absorção dos nutrientes, o que conduz a melhores resultados produtivos dos frangos de carne (Steenfield et al., 1998). Steenfield et al. (1998) ao adicionar uma preparação enzimática contendo xilanases e glucanases, numa dieta à base de trigo, conseguiu obter valores mais reduzidos de viscosidade dos conteúdos do jejuno e do íleo. Porém, esta resposta foi influenciada pela quantidade de trigo presente nas dietas, sendo mais pronunciada em dietas cujo nível de incorporação de trigo era superior a 80 %. Petersen et al. (1999) sugere ainda que existe uma diferença considerável entre a viscosidade dos conteúdos digestivos provocados por uma dieta à base de trigo e outra à base de cevada, com esta última a originar viscosidades mais altas.

No presente estudo, a porção de trigo nas dietas de iniciação e crescimento era bastante inferior a 80 %, não havendo qualquer incorporação de cevada. Ainda assim,

aos 19 dias de idade, a viscosidade do conteúdo digestivo do íleo dos animais submetidos ao tratamento XAP foi inferior relativamente ao verificado para o tratamento CN, mas não diferiu do tratamento XG. Este resultado está de acordo com os resultados obtidos para a quantificação da atividade enzimática da mistura XAP que mostrou ter uma maior afinidade para os arabinoxilanos do trigo, quando comparada com a mistura XG. Aos 35 dias de idade, não se observaram diferenças na viscosidade do conteúdo do duodeno e jejuno nem do íleo, entre tratamentos. Os resultados sugerem mais uma vez que o efeito da mistura enzimática teve maior influência na fase inicial do período de vida dos animais. Tal como foi referido anteriormente, os animais mais jovens aparentam beneficiar mais da suplementação enzimática por possuírem um sistema digestivo pouco desenvolvido e uma produção de enzimas endógenas insuficiente.

Steenfield et al. (1998) sugeriram que o efeito negativo da viscosidade deve ser maior durante as primeiras semanas de vida pois no seu trabalho verificaram que a suplementação enzimática, em dietas à base de trigo, teve um efeito bastante positivo no IC e no aumento de peso, durante as primeiras quatro semanas de vida. Todavia, deixaram de verificar uma resposta acentuada na adição de enzimas, no período dos 28 aos 42 dias, ao constatarem que a viscosidade dos conteúdos do íleo e do jejuno dos animais do controlo negativo se encontrava também bastante reduzida. Petersen et al. (1999) também referem que o aumento da idade por si só leva a uma diminuição da viscosidade dos conteúdos digestivos, o que pode ter sido o caso do presente ensaio.

O tamanho do tubo digestivo é influenciado pela densidade de nutrientes numa dieta. Uma dieta com uma baixa densidade em nutrientes pode resultar em 16 % de redução do tubo digestivo da ave (Bedford, 1996). Iji et al. (2001), concluíram que existe uma forte correlação entre a presença acentuada de PNA na dieta e um maior desenvolvimento dos órgãos do tubo digestivo. Segundo Marquardt et al. (2006), os tamanhos relativos dos órgãos do tubo digestivo da ave também podem ser consideravelmente reduzidos graças à adição de enzimas em dietas à base de cereais como o trigo e cevada. No trabalho aqui apresentado, o regime alimentar fornecido aos três tratamentos apresentava uma densidade energética e nutricional adequada, pois tratava-se de uma dieta à base de milho tipicamente comercial para frangos de carne, o que pode ter sido a razão pela qual não se verificaram diferenças nos pesos e comprimentos relativos dos órgãos do tubo digestivo, entre tratamentos. Visto o alimento não possuir teores de PNA revelantes, não provocou aumentos de viscosidade nem diminuição da velocidade do trânsito digestivo, não sendo por isso exetável uma alteração do tamanho dos compartimentos gastrointestinais.

Para a realização deste estudo, foram utilizadas misturas enzimáticas comerciais cujas especificações das atividades enzimáticas se encontravam em unidades diferentes, não sendo possível fazer uma comparação clara entre as duas. Assim, para dissipar dúvidas, foi realizado um ensaio enzimático com o objetivo de saber a exata atividade enzimática de cada uma das misturas, para os substratos testados. O complexo enzimático comercial XAP apresentou uma elevada atividade enzimática para o arabinoxilano do trigo e para o xilano solúvel. A mistura comercial XG apresentou maior atividade para o β -glucano. Para o arabinoxilano do trigo, a mistura comercial XAP apresentou valores superiores que XG. Estes resultados estão em conformidade com as diferenças encontradas no PV dos animais e na viscosidade do íleo, durante a fase inicial do ciclo produtivo dos animais.

A atividade enzimática inicial do alimento também foi avaliada. O regime alimentar de iniciação fornecido aos animais era constituído maioritariamente por milho e continha apenas uma pequena porção de trigo. Enquanto o regime alimentar de crescimento era igualmente rico em milho e continha uma maior quantidade de trigo relativamente ao regime de iniciação. Como o milho contém apenas cerca de 0,1 % de arabinoxilano solúvel e o trigo apresenta concentrações maiores, na ordem dos 1,8 % e apenas cerca de 0,4 % de β -glucano solúvel (Choct, 1997), os resultados obtidos para a atividade enzimática inicial do alimento estão em conformidade com o ensaio enzimático realizado. De acordo com os resultados obtidos através das placas de agar com os diferentes substratos, o regime alimentar XAP mostrou maior afinidade para o arabinoxilano enquanto que o regime alimentar XG mostrou maior afinidade para o β -glucano. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no ensaio enzimático para a determinação das unidades enzimáticas das misturas comerciais utilizadas na suplementação da dieta.

Quanto à atividade xilanásica dos conteúdos digestivos, esta foi pouco evidente no papo e na moela para todos os tratamentos. A maior atividade verificada ocorreu no duodeno, para todos os tratamentos, apesar de ser mais acentuada no caso do tratamento XAP. Os resultados obtidos permitiram verificar que o tratamento influenciou a atividade xilanásica no duodeno ($P < 0,05$) e que há tendência para que tenha influenciado a atividade xilanásica presente no íleo.

Relativamente à atividade glucanásica, não houve evidências de atividade enzimática na moela, duodeno, jejuno e íleo para nenhum dos tratamentos. Os cecos apresentaram atividade enzimática em todos os tratamentos, tanto para a xilanase como para a glucanase. No caso do papo, estes apresentaram atividade em praticamente todos os animais avaliados.

Fontes et al. (2004) sugerem que as enzimas exógenas devem atuar preferencialmente nos compartimentos anteriores ao intestino delgado. Assim a hidrólise de PNA ocorreria mais provavelmente no papo, uma vez que o pH do proventrículo e da moela é demasiado baixo para uma ação efetiva das enzimas adicionadas à dieta. Isto explicaria a ocorrência de atividade enzimática no papo no caso das dietas suplementadas. Mas também os animais do presente estudo que ingeriram o regime CN apresentam atividade enzimática no papo. Esta também pode dever-se à presença de glucanases endógenas nos cereais que compõem a dieta, à presença de uma microflora simbiótica no papo (Ponte et al., 2008) ou até à ingestão de fezes com vestígios de secreções microbianas. Contudo há que ter em conta que os regimes alimentares fornecidos não continham cevada e que a presença de β -glucanos no milho e no trigo é mínima. Assim, em conformidade com o defendido por Ponte et al. (2008), a atividade glucanásica no papo poderá ser potencialmente de origem microbiana.

Segundo Choct (1997), a presença de PNA solúveis na dieta faz aumentar o tempo de permanência dos conteúdos digestivos no intestino, o que provoca uma diminuição de oxigénio, potenciando o desenvolvimento de uma microflora anaeróbica e a atividade fermentativa. Todavia, como neste estudo as dietas fornecidas apresentavam uma baixa concentração de PNA solúveis, a pouca evidência de atividade enzimática ao longo do tubo digestivo sugere que pode não ter ocorrido fermentação considerável, manifestando assim baixa atividade enzimática. A atividade enzimática que se verifica nos cecos deve-se à existência de fermentações microbianas que aí naturalmente ocorrem tal como sugere (Leeson et al. (2001).

Conclusão

É conhecido que a suplementação enzimática em dietas à base de trigo, cevada e centeio melhora os parâmetros produtivos dos frangos de carne. No entanto, os efeitos destas enzimas em dietas à base de milho ainda é pouco claro.

O regime alimentar fornecido no presente estudo, com uma densidade energética e nutricional adequada para frangos de carne, era constituído maioritariamente por milho, apresentando também uma porção de trigo, tendo-se constituído diferentes tratamentos através da incorporação de dois complexos enzimáticos, um contendo xilanase, amilase e protease e outro contendo glucanase e xilanase.

A presença de xilanase, amilase e protease provocou aumentos de peso vivo e uma redução da viscosidade apenas nas primeiras três semanas de vida. Contudo, esta vantagem inicial não conduziu a diferenças nos parâmetros produtivos, entre tratamentos, ao fim das cinco semanas de idade. Estes resultados permitem concluir que a suplementação enzimática, mesmo em dietas à base de milho, parece ter um efeito importante apenas na fase inicial do ciclo produtivo dos animais. Apesar de não existirem diferenças significativas entre tratamentos no final do ensaio, verificou-se uma superioridade numérica no peso vivo dos animais sujeitos a suplementação com xilanase, amilase e protease, ao longo de todo o estudo. Tal resultado pode sugerir que a incorporação de misturas enzimáticas deste tipo, em dietas à base de milho e trigo, poderá ter algum fundamento e conduzir a uma melhoria efetiva dos parâmetros produtivos de frangos de carne, uma vez que podem auxiliar a degradação dos arabinoxilanos do trigo e aumentar a eficiência da digestão do amido. No entanto os resultados também sugerem que esta melhoria poderá ser mais efetiva se alteradas algumas condições, tal como uma pequena redução da densidade energética do alimento, mantendo a quantidade de milho presente, uma vez que trabalhos anteriores já mostraram resultados satisfatórios nesse sentido.

Referências Bibliográficas

- Abbas, R.Z, Munawar, S.H., Manzoor, Z., Iqbal, Z., Khan, M.N., Saleemi, M.K., Zia, A.M., Yousaf, A. (2011). Anticoccidial effects of acetic acid on performance and pathogenic parameters in broiler chickens challenged with *Eimeria tenella*. *Pesq. Vet. Bras.* 31 (2), 99-103.
- Abudados, A. M. (2010). Enzyme supplementation of corn-soybean meal diets improves performance in broiler chicken. *International Journal of Poultry Science* 9 (3), 292 - 297.
- Abudados, A. M. (2012). Effect of enzyme supplementation to normal and low density broiler diets based on corn-soybean meal. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 7 (2), 139 - 142.
- Appleby, M.C.; Hughes, B.O., Elson, H. A. (1992). *Poultry Production Systems: Behaviour, Management and Welfare*. UK.
- Baptista, M.E.S. (1984). A técnica da energia metabolizável verdadeira, revisão. *Rev. Port. Ciênc. Veter.* 469 (79), 42-57.
- Barbosa, M.J.B, Junqueira, O.M., Andreotti, M.O., Cancherini, L.C. (2002). Exigências de lisina e metionina+cistina digestíveis para frangos de corte na fase final. *Maringá* 4 (24), 1001-1006.
- Bedford, M. R. (2000). Exogenous enzymes in monogastric nutrition - their current value and future benefits. *Animal Feed Science and Technology* 86, 1-13.
- Bedford, M., 2008. Enzymes help feed to remain profitable. *Feed Mix* 5 (16), 21-23
- Bedford, M.R., Schulze, H. (1998). Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutrition Research Reviews* 11, 91-114.
- Bell, D. D., North, M.O. (1990). *Commercial Chicken Production Manual* (4th ed.). Van Nostrand Reinhold.
- Campos, L.S. (2008). *Entender a Bioquímica* (5ª edição). Escolar Editora.
- Choct, M. (1997). Feed Non-Starch Polysaccharides: Chemical Structures and Nutritional Significance. *Feed Milling International*, 13-26.
- Choct, M. (2006). Enzymes for the feed industry: past, present and future. *World's Poultry Science Journal* 62.
- Cowieson, A. J., Adeola, O. (2005). Carbohydrases, proteases and phytase have an additive beneficial effect in nutritional marginal diets for broilers chicks. *Poultry Science* 84, 1860-1867.
- Cowieson, A. J., Bedford, M. R., Ravindran, V. (2010). Interactions between xylanase and glucanase in maize-soy-based diets for broilers. *British Poultry Science* 51 (2), 246 - 257.
- Cowieson, A. J., Ravindran, V. (2008). Effect of exogenous enzymes in maize-based diets varying in nutrient density for young broilers: growth performance and

- digestibility of energy, minerals and amino acids. *British Poultry Science* 49 (1), 37-44.
- Dusel, G., Kluge, H., Jeroch, H., 1998. Xylanase supplementation of wheat-based rations for broilers: influence of wheat characteristics. *J. Appl. Poultry Res.* 7, 119-131.
- Englert, S. (1982). *Avicultura* (4ª edição). Leal.
- Fersht, A. (1987). *Enzyme Structure and Mechanism* (2nd ed.).
- Figueiredo, A. A., Correia, B. A., Ribeiro, T., Ponte, P., Falcão, L., Freire, J. P., Prates, J. A. M., Ferreira, L. M. A., Fontes, C., Lordelo, M. M. (2012). The effects of restricting enzyme supplementation in wheat-based diets to broilers. *Animal Feed Science and Technology* 172, 194-200.
- Fontes, C.M.G.A., Ponte, P.I.P, Reis, T.C., Soares, M.C., Gama, L.T., Dias, F.M.V, Ferreira, L.M.A. (2004). A family 6 carbohydrate-binding module potentiates the efficiency of recombinant xylanase used to supplement cereal-based diets for poultry. *British Poultry Science* 45 (5), 648-656.
- Gao, F., Jiang, Y., Zhou, G. H., Han, Z. K. (2007). The effects of xylanase supplementation on performance, characteristics of the gastrointestinal tract, blood parameters and gut microflora in broilers fed on wheat-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 142, 173-184.
- Gracia, M. I., Aranibar, M. J., Lázaro, R., Medel, P., Mateos, G. G. (2003). α -amylase supplementation of broiler diets based on corn. *Poultry Science* 82, 436-442.
- Greiner, R., Konietzny, U. (2010). Phytases: Biochemistry, enzymology and characteristics relevant to animal feed use. In M.R. Bedford & G.G. Partridge (Ed.), *Enzymes in farm nutrition* (2nd ed.). (pp. 96 - 101). CABI
- Guardabassi, L., Jensen, L.B., Kruse, H. (2008). *Guia de Antimicrobianos em Veterinária*. Artmed Editora S.A.
- Hill, F.W., Anderson, D.L. (1958). Comparison of metabolizable energy and productive energy determination with growing chicks. *The Journal of Nutrition* 64, 587-603.
- Iji, P. A., Saki, A. A., Tivey, D.R. (2000). Intestinal development and body growth of broiler chicks on diets supplemented with non-starch polysaccharides. *Animal Feed Science and Technology* 89, 175-188.
- Józefiak, D., Rutkowski, A., Jensen, B. B., Engberg, R. M. (2013). The effect of β -glucanase supplementation of barley and oat-based diets on growth performance and fermentation in broiler chicken gastrointestinal tract. *British Poultry Science* 47, 57-64.
- Kattak, F.M., Pasha, T.N., Hayat, Z., Mahmud, A. (2006). Enzymes in poultry nutrition. *J. Anim. Pl. Sci.* 16, 1-7.
- Larbier, M. e Leclercq, B. (1991). *Nutrition et Alimentation des Volailles*. INRA.
- Leeson, S., Summers, J. D. (2001). *Scott's Nutrition of the Chicken* (4th ed.). Canada: University Books.

- Marquardt, R. R., Brenes, A., Zhang, Z., Boros, D. (1996). Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Animal Feed Science Technology* 60, 321-330.
- Marquardt, R.R., Brenes, A., Zhang, Z., Boros, D. (1996). Use of enzymes to improve nutrient availability in poultry feedstuffs. *Animal Feed Science Technology* 60, 321-330.
- Mateos, G.G., Blas, C., Rebollar, P.G. (2010). *Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la fabricación de piensos compuestos* (3ª ed.). Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Mavromichalis, I. (2012, September). Mixed or single enzymes for non-starch carbohydrates? *All About Feed*, 25 -26.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (2002). *Animal Nutrition* (6th ed.) Pearson.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid for determination of reducing sugar. *Anal. Chemic.* 11, 426-428.
- Mombaerts, R. (2012, September). NSP enzymes play positive role in prebiotic formation. *All About Feed*.
- Mountney, P. (1988). *Poultry Meat and Egg Production*. Avi Book.
- Nelson, D.L., Cox, M.M. (2004). *Lehninger, Principles of Biochemistry* (4th ed.). W.H.Freeman.
- Noy, Y., Sklan, D. (1997). Posthatch development in poultry. *J. Appl. Poultry Res.* 6, 344-345.
- Noy, Y., Sklan, D. (1999). Energy utilization in newly hatched chicks. *Poultry Science* 78, 1750-1756.
- Noy, Y., Sklan, D. (2001). Yolk and exogenous feed utilization in the posthatch chick. *Poultry Science* 80, 1490-1495.
- NRC, 1994. *Nutrient Requirements for Poultry* (9th ed.) National Academy Press.
- Odetallah, N.H. (2010). Use of enzymes in corn-soybean poultry diets. *All About Feed*. Acedido em Abr. 12, 2013, disponível em: <http://www.allaboutfeed.net/Nutrition/Feed-Additives/2010/9/Use-of-enzymes-in-corn-soybean-poultry-diets-AAF011674W/>
- Oxenboll, K.M., Pontoppidan, K., Fru-Nji, F. (2011). Use of protease in poultry feed offers promising environmental benefits. *International Journal of Poultry Science* 10 (11), 842-848.
- Paloheimo, M., Piironen, J., Vehmaanpera (2010). J. Xylanases and Cellulases as Feed Adivites. in Enzymes. In M.R.Bedford & G.G. Partridge (Eds.), *Farm Nutrition* (2nd ed.). CABI.
- Petersen, S. T., Wiseman, J., Bedford, M. R. (1999). Effects of age and diet on the viscosity of intestinal contents in broiler chicks. *British Poultry Science* 40, 364-370.

- Ponte, P. I., Lordelo, M. M., Guerreiro, C.I.P.D., Soares, M.C., Mourão, J.L., Crespo, J.P., Crespo, D.G., Prates, J.A.M, Ferreira, L.M.A., Fontes, C.M.G.A. (2008). Crop β -glucanase activity limits the effectiveness of a recombinant cellulase used to supplement a barley-based feed for free-range broilers. *British Poultry Science* 49 (3), 347-359.
- Ravindran, V. (2012). Poultry feed availability and nutrition in developing countries. *Poultry Development Review*. FAO. Acedido a Abr, 26, 2013, disponível em: www.fao.org/ag/againfo/themes/en/poultry/AP_nutrition.html.
- Ribeiro, A.M.L, Kessler, A.M., Júnior, A.M.P., Krabbe, E.L., Brugalli, I., Pophal, S. (2000). Avaliação da Monensina no Desempenho e Rendimento de Carcaça e Partes de Frangos de Corte. *Rev. bras. zootec.* 29(4), 1141-1152.
- Ribeiro, T., Lordelo, M., Ponte, P., Maças, B., Prates, J., Fontes, M. A., Falcão, L., Freire, J., Ferreira, L., Fontes, C. (2011). Levels of endogenous β -glucanase activity in barley affect the efficacy of exogenous enzymes used to supplement barley-based diets for poultry. *Poultry Science* 90, 1245-1256.
- Scheuermann, G.N, Maier, J.C., Bellaver C., Fialho, F.B., 1995. Metionina e Lisina no desenvolvimento de frangos de corte. *Rev. Bras. de Agrociência* 2(1), 75-86.
- Scragg, A.H. (1988). *Biotechnology for Engineers, Biological Systems in Technological Processes*. Ellis Horwood Limited.
- Sibbald, I. R., S. J. Slinger (1963). A biological assay of ME in poultry feed ingredients together with findings which demonstrate some of the problems associated with the evaluation of fats. *Poult. Sci.* 42:313.
- Sibbald, I.R. (1976). A Bioassay for True Metabolizable Energy in Feedingstuffs. *Poultry Science* 55, 303-308.
- Sklan, D., Noy, Y. (2000). Hydrolisis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. *Poultry Science* 79, 1306-1310.
- Slominski, B.A. (2011). Recent advances in research on enzymes for poultry diets. *Poultry Science* 90, 2003-2023.
- Smith, J.E. (1996). *Biotechnology* (3rd ed.) Cambridge University Press.
- Steenfeldt, S., Mullerzt, A., Jensen, J. F. (1998). Enzyme supplementation of wheat-based diets for broilers 1. Effect on growth performance and intestinal viscosity. *Animal Feed Science and Technology* 75: 27-43.
- Troche, C., Sun, X., McElroy, A. P., Remus, J., Novak, C. L. (2007). Supplementation of Avizyme 1502 to corn-soybean meal-wheat diets fed to turkey tom poults: the first fifty-six days of age. *Poultry Science* 86, 496-502.
- Uni, Z. Ganot, S., Sklan, D. (1998). Posthatch development of mucosal function in the broiler small intestine. *Poultry Science* 77, 75-82.
- Verstegen, M.W.A., Poel, A.F.B. (2009). *Grains in Nutrition for Farm Animals*. XXV Curso de Especializacion. FEDNA.
- West, M. L., Corzo, A., Dozier, W. A., Blair, M. E., Kidd, M. T. (2007). Assessment of dietary rovbio excel in practical United States broiler diets. *J. Appl. Poult. Res.* 16, 313-321.

- Yu, B., Chung, T. K. (2004). Effects of Multiple-enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. *J. Appl. Poult. Res.* 13, 178-182.
- Yu, B., Wu, S. T., Liu, C. C., Gauthier, R., Chiou, P. W. S. (2007). Effects of enzyme inclusion in a maize-soybean diet on broiler performance. *Animal Feed Science and Technology* 134, 283-294.
- Zanella, I., Sakomura, N. K., Silversides, F. G., Figueiredo, A., Pack, M. (1999). Effect of enzyme supplementation of broiler diets based on corn and soybeans. *Poultry Science* 78, 581 - 568.
- Zou, B., Chung, T. K., Effects of multiple enzyme mixtures on growth performance of broilers fed corn-soybean meal diets. *J. Appl. Poult. Res.* 13, 178-182.
- Zou, J., Zheng P., Zhang K., Ding, X., Bai, S., 2013. Effects of exogenous enzymes and dietary energy on performance and digestive physiology of broilers. *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4 (14).